

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Biologie

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Silvie Tománková

Molekulární mechanismy zodpovědné za regulaci apoptózy nádorových buněk prostaty po působení TRAILu a chemoterapeutických látek

Molecular mechanisms responsible for regulation of apoptosis in prostate cancer cells treated with TRAIL and chemotherapeutic drugs

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.4.2013

Poděkování

Ráda bych především poděkovala své vedoucí práce RNDr. Aleně Hyršlové Vaculové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, ochotu, trpělivost a cenné rady při jejím řešení. Prof. RNDr. Jiřině Hofmanové, CSc. a prof. RNDr. Aloisovi Kozubíkovi, CSc. za vytvoření vhodných podmínek pro vyhotovení experimentální části diplomové práce, která byla realizována na Oddělení cytokinetiky na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně a všem členům Oddělení cytokinetiky BFÚ AV ČR za rady a pomoc.

Abstrakt

Nádorové onemocnění prostaty představuje jednu z nejčastějších příčin úmrtí u mužů na nádorová onemocnění. Pro léčbu jeho pozdějších stádií se využívá zejména chemoterapie, způsobující nepříjemné vedlejší účinky. Jelikož léčba pokročilých stádií tohoto nádorového onemocnění není často dostatečně účinná, hledají se nové alternativy. Vhodným kandidátem může být cytokin TRAIL, který indukuje apoptózu u nádorových buněk organismu a současně není toxický pro buňky nenádorové. Terapie TRAIlem je ovšem limitována četným výskytem rezistence nádorových buněk. Překonání rezistence může být dosaženo kombinovanou terapií TRAILu spolu s vhodným sensitizátorem. V této práci se zabývám možnou efektivní eliminací nádorových buněk prostaty kombinací TRAILu s platinovými chemoterapeutickými látkami, cisplatinou a jejím novým derivátem LA-12. Pro experimentální část práce byly využity 3 nádorové buněčné linie prostaty a pomocí analýzy Western blot a průtokové cytometrie u nich bylo prokázáno, že použitím TRAILu v kombinaci s CDDP nebo LA-12 dochází k významnému posílení apoptózy. Účinek těchto látek doprovází aktivace/nárůst množství některých proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, současně však nebyly zaznamenány změny množství receptorů pro TRAIL. Výsledky této práce ukazují, že zejména kombinace TRAILu spolu s LA-12 by mohla být slibnou variantou pro budoucí léčbu, jelikož LA-12 je účinná i v mnohem nižších koncentracích ve srovnání s cisplatinou.

Klíčová slova: Apoptóza, TRAIL, platinová cytostatika, nádorové onemocnění prostaty, cisplatina, LA-12, kombinovaná terapie

Abstract

Prostate cancer is one of the most common cancer-related causes of death among men. Chemotherapy is mainly used for treatment of its later stages, accompanied by unpleasant side effects. So far, the treatment of advanced stages of prostate cancer has not been sufficient, and new more effective alternatives are needed. The application of the TRAIL cytokine, which induces apoptosis in tumor cell, but is not toxic to nonmalignant cells, seems to be a promising approach. However, TRAIL-based therapy is often limited by the emerging cancer cell resistance. Overcoming the resistance can be achieved by combination therapy of TRAIL with effective sensitizers. Within this work, a combination of TRAIL with platinum-based chemotherapeutic drugs such as cisplatin or its novel derivative LA-12 was applied in order to facilitate the elimination of prostate cancer cells. In the experimental part of this work, using Western blot and flow cytometry analysis it was shown that TRAIL in combination with CDDP or LA-12 effectively enhanced apoptosis in three human prostate cancer cell lines. This effect was accompanied with increased activation/amount of several proapoptotic Bcl-2 family proteins, while no changes in the level of the receptors for TRAIL were observed. These results demonstrated that especially the combination of TRAIL with LA-12 could be a promising alternative treatment, because LA-12 is effective in much lower concentrations in comparison with cisplatin.

Keywords : Apoptosis, TRAIL, platinum cytostatics, prostate cancer, cisplatin, LA-12, combined therapy

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce.....	8
3	Přehled literatury.....	9
3.1	Nádorové onemocnění prostaty.....	9
3.2	Apoptóza.....	10
3.2.1	Proteiny rodiny Bcl-2.....	11
3.2.1.1	Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death).....	13
3.2.1.2	Noxa.....	15
3.3	TRAIL.....	16
3.4	Chemoterapie.....	18
3.4.1	Platinové chemoterapeutické látky.....	18
3.4.1.1	Cisplatina (cis-diamminedichlorplatinum (II)).....	18
3.4.1.1.1	Mechanismus působení CDDP.....	19
3.4.1.1.2	Možné mechanismy rezistence buněk k CDDP.....	20
3.4.1.2	Karboplatina (cis-diammin-cyklobutan-1,1-dikarboxylátolatinatý komplex).....	22
3.4.1.3	Oxaliplatina (1R,2R-diammin-cyklohexan-oxalátolatinatý komplex).....	24
3.4.1.4	Satraplatina (JM216).....	25
3.4.1.5	LA-12 ((OC-6-43)-bis(acetato)-(1-adamantylamin)-ammin-dichloroplatičitý komplex).....	25
3.4.1.5.1	Mechanismus působení LA-12.....	26
3.4.1.6	Platinové chemoterapeutické látky u nádorového onemocnění prostaty.....	26
3.5	Kombinovaná terapie.....	27
3.5.1	Možné mechanismy působení kombinované terapie.....	28
3.5.1.1	CDDP.....	28
3.5.1.2	Karboplatina.....	29
3.5.1.3	Oxaliplatina.....	30
3.5.1.4	LA-12.....	30
4	Materiál a metody.....	32
4.1	Charakterizace použitých buněčných linií a jejich kultivace.....	32
4.2	Uspořádání experimentů.....	32
4.3	Použité chemikálie.....	33
4.4	Příprava buněčných lyzátů a kvantifikace proteinů ve vzorcích.....	34
4.5	Elektroforetická separace proteinů, westernový přenos a imunodetekce.....	35
4.6	Detekce apoptózy pomocí protilátky M30 CytoDEATH.....	37

5	Výsledky	38
5.1	Posílení aktivace kaspáz kombinovaným působením TRAILu a CDDP, LA-12) ...	38
5.2	Zvýšené štěpení substrátů kaspáz po kombinovaném působení TRAILu a CDDP/LA-12	39
5.3	Celkové množství receptorů pro TRAIL po kombinovaném působení TRAILu a CDDP/LA-12	41
5.4	Změny exprese vybraných anti-apoptotických proteinů působením TRAILu a CDDP/LA-12	42
5.5	Změny v množství pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 působením LA-12/CDDP a TRAILu	43
5.6	Koncentrační a časově závislé změny množství proteinu Noxa působením LA-12/ CDDP	44
5.7	Fosforylace proteinů ERK a p38 působením TRAILu a CDDP/ LA-12	46
6	Diskuze	47
7	Souhrn	52
	Seznam zkratk	53
8	Seznam literatury	55

1 Úvod

Nádorové onemocnění prostaty je velmi závažným onemocněním, jelikož je jednou z nejčastějších příčin úmrtí u mužů ve vyspělých zemích. V časných stádiích je léčba zaměřena zejména na odstranění působení androgenů (chirurgicky či chemicky) nebo na blokádu androgenních receptorů. V pozdějších stádiích nádorového onemocnění prostaty se využívá chemoterapie, která působí jak na buňky nádorové, tak na zdravé buňky organismu a má často značné vedlejší účinky. Jelikož tato léčba není v mnoha případech dostatečně účinná, intenzivně se zkoumají nové přístupy vedoucí k indukci/posílení apoptózy nádorových buněk. Vhodným kandidátem je cytokin TRAIL indukující apoptózu u nádorových buněk, bez toxického účinku na buňky normální. Protože nádorové buňky prostaty jsou často rezistentní k monoterapii TRAIlem, je zkoumána možná kombinovaná terapie, pomocí které by mohla být rezistence k apoptóze indukované TRAIlem překonána.

Pro kombinovanou terapii by mohly mít velký význam chemoterapeutické látky na bázi platiny, jako je cisplatina nebo LA-12. Cisplatina je látka schválená Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), nachází se v oxidačním stavu II a již v minulosti byla běžně využívána při léčbě nádorových onemocnění. Významným klinickým problémem cisplatiny je ovšem její toxicita a to zejména nefro- a neurotoxicita. Z toho důvodu jsou studovány nové deriváty platinových látek jako je LA-12. Nachází se v oxidačním stavu IV a na rozdíl od cisplatiny může být podávána perorálně. Kombinací platinové látky a TRAILu může dojít k významnému posílení apoptózy na různých úrovních intracelulární signální dráhy, a k selektivní a účinné eliminaci nádorových buněk prostaty. Zároveň by mohly být látky použité při kombinované terapii podávány ve výrazně nižších koncentracích ve srovnání s monoterapií. Cisplatina a/nebo LA-12 by mohly překonat rezistenci nádorových buněk prostaty k apoptóze indukované TRAIlem. Z toho důvodu je objasnění mechanismů působení kombinované terapie (TRAILu spolu s platinovou chemoterapeutickou látkou) zajímavé a důležité pro možné budoucí využití v klinické praxi.

2 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo:

- a) Zcitlivět lidské nádorové buňky prostaty k apoptóze indukované cytokinem TRAIL prostřednictvím chemoterapeutických látek na bázi platiny, cisplatiny a LA-12.
- b) Popsat změny na úrovni vybraných regulačních molekul, které doprovází posílení apoptózy po kombinovaném působení těchto látek.

Pro studium účinků cytokinu TRAIL, cisplatiny a LA-12 byly vybrány a srovnány tři nádorové buněčné linie prostaty (DU-145, PC-3 a LNCaP) a byly navrženy zajímavé molekuly s možnou potenciální funkční úlohou v posílení apoptózy indukované TRAIlem působením cisplatiny a LA-12.

3 Přehled literatury

3.1 Nádorové onemocnění prostaty

Nádorové onemocnění prostaty je považováno za druhé nejčastější onkologické onemocnění u mužů a to zejména v Americe a Západní Evropě (Jemal *et al.*, 2005). Během vývoje tohoto onemocnění se mohou uplatňovat různé faktory jako je věk, životní styl, rodinná anamnéza nebo genetické změny (Giovannucci *et al.*, 1993).

Nejdůležitější roli ve vývoji nádorového onemocnění prostaty hrají mužské pohlavní hormony (androgeny), které významně podporují proliferaci a přežívání nádorových buněk a zároveň potlačují apoptózu. Proto je při léčbě nádorového onemocnění prostaty, zejména v počátečních fázích, snahou odstranit působení androgenů (chirurgicky či chemicky) nebo blokáda androgenních receptorů, což je podstatou anti-androgenní terapie (Huggins and Hodges, 1941; Tran *et al.*, 2009). Existuje řada inhibitorů androgenních receptorů, např. hydroxyflutamid a bicalutamid (Culig *et al.*, 1999; Hofbauer *et al.*, 1999; Masiello *et al.*, 2002), naznačená léčba je však účinná pouze u omezeného počtu pacientů.

V pozdějších stádiích nádorového onemocnění prostaty se využívá chemoterapie. Mezi běžně používané chemoterapeutické látky při léčbě tohoto onemocnění patří například estramustin fosfát, mitoxantron, vinblastin, doxorubicin, paclitaxel nebo etoposid. Standardní léčbou zejména metastazujícího hormonálně refrakterního karcinomu prostaty (HRPC) je v současné době použití docetaxelu spolu s prednisonem. (Garmey *et al.*, 2008; Huang and Hung, 2009). Při terapii nádorového onemocnění se také mohou využívat chemoterapeutické látky na bázi platiny. Byla pozorována aktivita karboplatiny u jedinců, u kterých došlo k progresi po působení docetaxelu (Oh *et al.*, 2005). Zdá se, že by se platinová chemoterapeutika (jako je oxaliplatina nebo cisplatina) mohla uplatnit i při léčbě vzácných forem nádorového onemocnění prostaty (Ciszewski *et al.*, 2008; Roldan *et al.*, 2012).

Chemoterapeutické látky jsou toxické pro většinu intenzívně proliferujících buněk včetně některých normálních a mají často značné vedlejší účinky. Proto jsou zkoumány nové účinnější způsoby terapie, současně šetrnější ke zdravým tkáním organismu.

3.2 Apoptóza

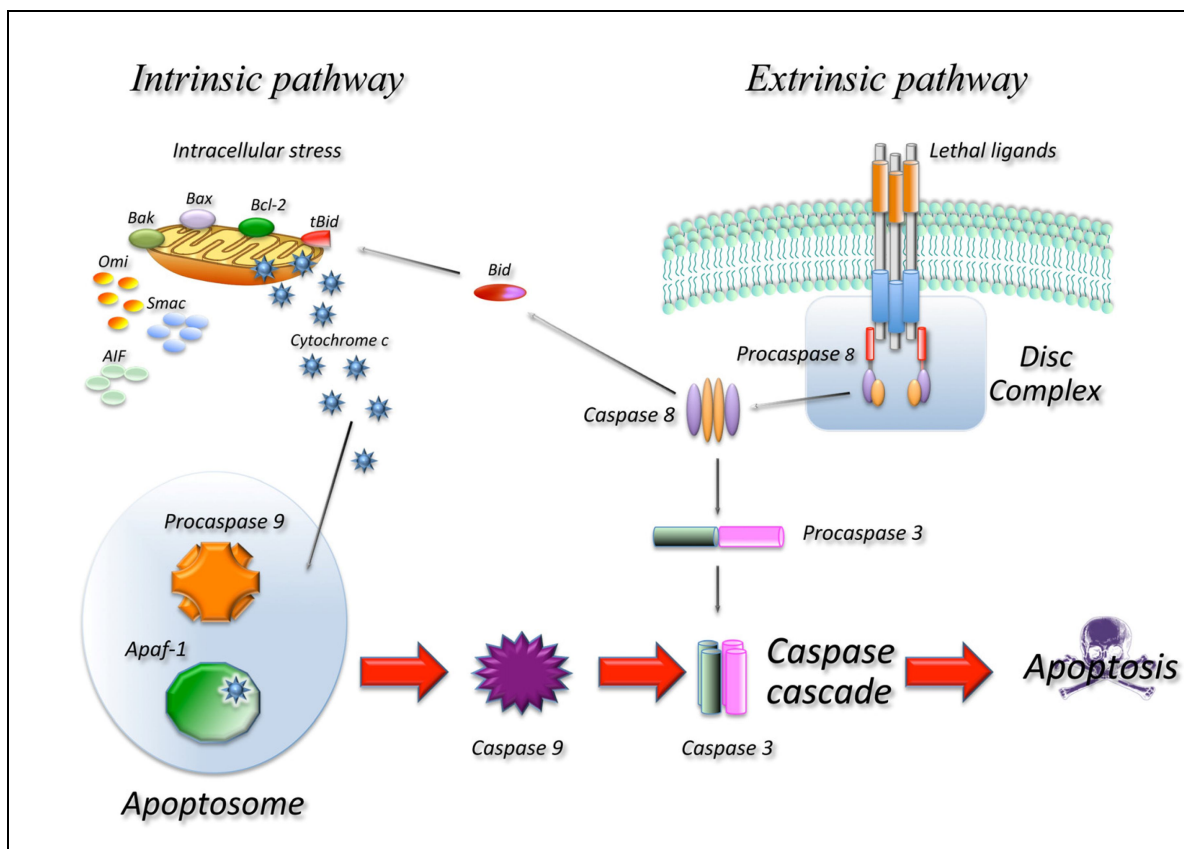
Apoptóza je typem programované buněčné smrti a je nezbytná pro normální vývoj organismu a udržení tkáňové homeostázy. Pomocí apoptózy dochází k účinnému odstranění starých, přebytečných nebo poškozených buněk z organismu. Pro spuštění a propagaci apoptotického signálu je nutná aktivace řady specifických molekul, z nichž typickým příkladem jsou kaspázy. Podle struktury a funkce můžeme kaspázy rozdělit do dvou skupin – iniciační (kaspáza -2, -8, -9 a -10 obsahující dlouhou prodoménu) a efektorové (kaspáza -3, -6 a -7, s krátkou prodoménou). K aktivaci efektorových kaspáz dochází jejich štěpením pomocí iniciačních kaspáz a takto aktivované kaspázy pak dále štěpí řadu proteinů v buňce a podílí se tak významně v exekuční fázi apoptózy (Zhivotovsky, 2003; Kumar, 2007).

Existují dvě základní dráhy indukce apoptózy – vnější (přes receptory smrti) a vnitřní (mitochondriální), obě se mohou vzájemně ovlivňovat (Obr. 1) (Igney and Krammer, 2002). Pro spuštění vnější dráhy je zapotřebí transmembránových receptorů smrti („death receptors“), které po aktivaci specifickými ligandy spouští kaskádu reakcí vedoucí k apoptóze (Chicheportiche *et al.*, 1997; Ashkenazi and Dixit, 1998; Peter and Krammer, 1998; Locksley *et al.*, 2001; Suliman *et al.*, 2001; Rubio-Moscardo *et al.*, 2005). Pro iniciaci této dráhy je klíčová kaspáza -8 (-10), která dále štěpí efektorové kaspázy.

Vnitřní dráha probíhá přes mitochondrie, což jsou důležité organely účastnící se apoptózy. V mezimembránovém prostoru mitochondrií se nachází mnoho pro-apoptotických faktorů jako je cytochrom c, AIF („apoptosis inducing factor“) nebo Smac/Diablo („direct IAP binding protein with low pI“), které jsou uvolněny do cytosolu jako odpověď na apoptotické signály (poškození DNA, oxidativní stres, chemoterapeutické látky, virová infekce a další). Cytochrom c uvolněný z mitochondrií se v přítomnosti ATP váže s Apaf-1 („Apoptotic protease-activating factor 1“) a tento komplex aktivuje pro-kaspázu -9, která spouští aktivaci dalších kaspáz a následnou apoptózu buňky (Budihardjo *et al.*, 1999; Saelens *et al.*, 2004). Jako důležité regulátory mitochondriální dráhy slouží proteiny rodiny Bcl-2 díky své pro-apoptotické (např. Bax, Bak, Bid) nebo anti-apoptotické (např. Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) funkci (Huang and Strasser, 2000; Antonsson, 2001).

Efektorové kaspázy hrají důležitou roli v exekuční fázi apoptózy. Za hlavní efektorovou kaspázu je považována kaspáza -3, jejíž aktivace je důležitá pro štěpení řady specifických substrátů jako je protein lamin B, PARP nebo cytokeratin 18 (Porter and Janicke, 1999). K rozrušení jaderné membrány v průběhu procesu buněčné smrti přispívá

štěpení jaderných laminů (jako je lamin B) efektorovými kaspázami a probíhá v pozdní fázi apoptózy (Rao *et al.*, 1996). Cytokeratin 18 je jedna z hlavních komponent cytoskeletu epiteliálních buněk. Během procesu apoptózy nastává dramatická reorganizace cytokeratinu 18, který je štěpen efektorovými kaspázami (Caulin *et al.*, 1997; MacFarlane *et al.*, 2000). Protein PARP je jaderný enzym zapojený do oprav DNA, aktivace nastává při poškození DNA a jedná se o charakteristický endogenní substrát kaspázy -3 (Kaufmann *et al.*, 1993).

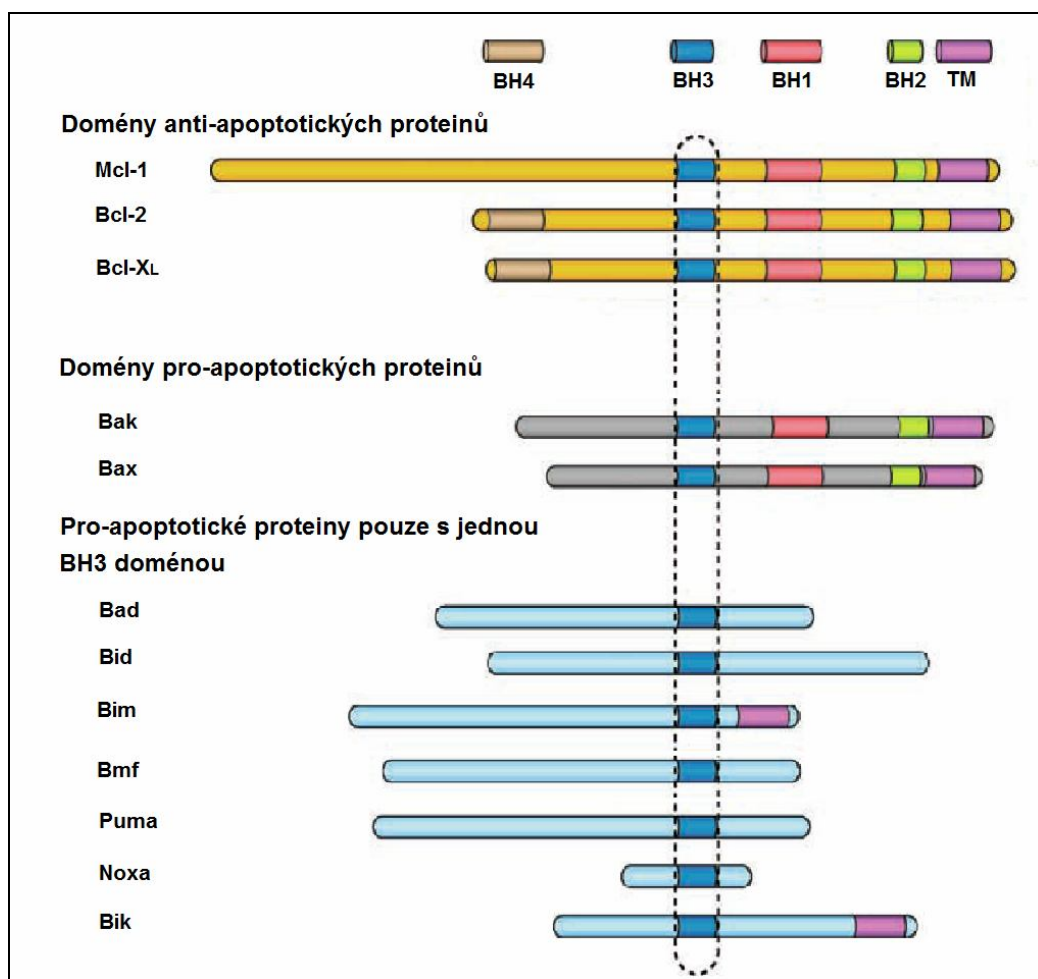


Obr. 1 Zjednodušené schéma vnější a vnitřní dráhy apoptózy. Upraveno podle Favaloro (2012).

3.2.1 Proteiny rodiny Bcl-2

Proteiny rodiny Bcl-2 regulují mitochondriální dráhu apoptózy ovlivněním integrity vnější mitochondriální membrány a můžeme je rozdělit do několika skupin, podle jejich struktury a funkce. Tyto proteiny obsahují Bcl-2 homologní domény (BH domény, BH1-BH4), které zprostředkovávají jejich vzájemné interakce (Obr. 2). Právě při jejich součinnosti se rozhoduje, zda proběhne apoptóza, nebo jestli buňka přežije. Proteiny s anti-apoptotickou funkcí jako jsou Bcl-2 nebo Bcl-X_L obsahují všechny 4 domény, zatímco

pro-apoptotické proteiny si zachovaly jen některé z těchto domén, nebo pouze BH3 doménu (Falschlehner *et al.*, 2007).

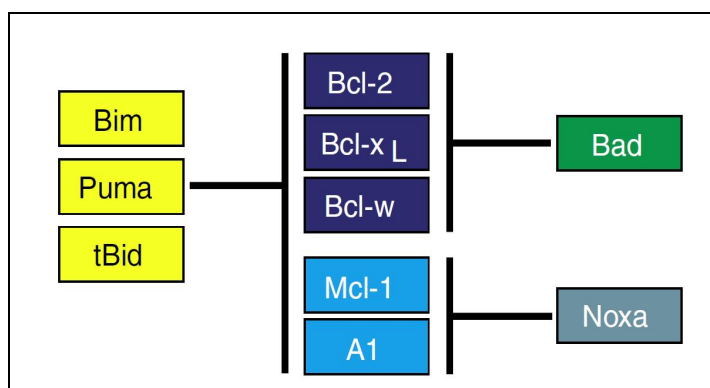


Obr. 2 Homologní domény vybraných proteinů rodiny Bcl-2 (BH – Bcl-2 homologní doména, TM – transmembránová doména). Upraveno podle Danial (2008).

Pokud je buňka vystavena stresovému prostředí, může dojít k indukci tzv. „BH3-only“ proteinů, které jsou schopné vázat se na anti-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (Obr. 3). Po této vazbě následuje změna konformace anti-apoptotických proteinů a inhibice jejich působení (např. dále nedochází k tvorbě heterodimerů s proteiny Bax a Bak). Díky tomu může dojít k oligomerizaci pro-apoptotických proteinů Bax a/nebo Bak na vnější mitochondriální membráně a k tvorbě pórů, čímž nastává uvolnění pro-apoptotických faktorů z mezimembránového prostoru a aktivace kaspáz. Bylo prokázáno, že proteiny rodiny Bcl-2 se v buňce nacházejí jak vázané na membránách (mitochondriálních, jaderné, endoplazmatického retikula) pomocí jejich C-terminální kotvy, tak v solubilní formě. Protein Bax se za normálních podmínek vyskytuje převážně v cytosolu a až v průběhu apoptózy se

přemísťuje do mitochondriální membrány. Naopak protein Bak se již vyskytuje přímo v mitochondriích, kde je ovšem vázán například s proteinem Mcl-1 nebo Bcl-X_L, a tím je inhibován jeho pro-apoptotický účinek do doby, než dojde k indukci apoptózy (Goping *et al.*, 1998; Shimazu *et al.*, 2007; Youle and Strasser, 2008).

Proteiny rodiny Bcl-2 jsou předmětem intenzivního výzkumu, jelikož jsou velmi významnými regulátory apoptózy a objasnění všech jejich funkcí a interakcí je důležitým předpokladem pro účinnou léčbu různých onemocnění. V níže uvedeném textu se zabývám zejména proteiny Noxa a Bim, které mohou hrát významnou úlohu při modulaci apoptózy indukované TRAILem. Významné změny v jejich množství byly pozorovány v rámci této diplomové práce po působení cytokinu TRAIL a vybraných chemoterapeutických látek u nádorových buněk prostaty (viz. níže).

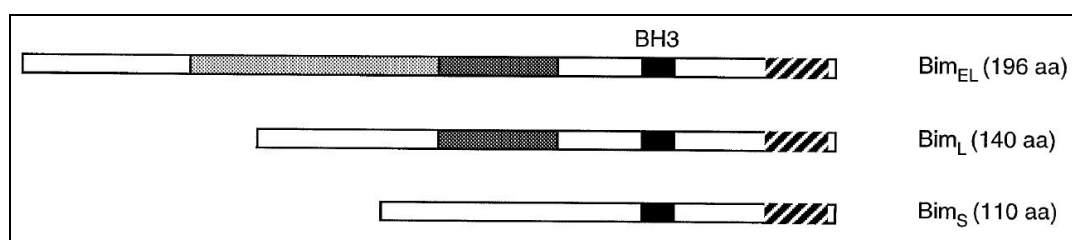


Obr. 3 Působení pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 na anti-apoptické proteiny.

Převzato z Adams a Cory (2007).

3.2.1.1 Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death)

Dvě vědecké skupiny nezávisle na sobě identifikovaly v roce 1998 protein Bim, který byl charakterizován jako pro-apoptotický protein z rodiny Bcl-2 obsahující pouze doménu BH3. Doména BH3 je nezbytná pro interakci proteinu Bim s anti-apoptotickými proteiny rodiny Bcl-2, kterými jsou zejména Bcl-X_L, Mcl-1 a Bcl-2. Bim se podílí na regulaci buněčné smrti, kterou indukuje u různých buněčných typů jako odpověď na celé spektrum podnětů (např. nedostatek růstových faktorů, deprivace cytokinů a další). V normálních podmínkách se tento protein váže na dyneinový lehký řetězec DLC-1/LC8 v dyneinovém motorovém komplexu a uvolňuje se až po působení příslušného signálu. Díky alternativnímu sestřihu se tento protein může vyskytovat v řadě izoform, z nichž nejznámější jsou tři (Bim_{EL}, Bim_L a Bim_S). Všechny tyto izoformy jsou schopné ovlivňovat apoptózu, ovšem nejkratší izoforma je v indukci apoptózy nejúčinnější (Obr. 4) (O'Connor *et al.*, 1998; Puthalakath *et al.*, 1999).



Obr. 4 Izoformy proteinu Bim. Převzato z O'Connor (1998)

Pro-apoptotický účinek proteinu Bim může být u epiteliálních buněk transkripčně a post-translačně modulován signální dráhou RAF/MEK/ERK, kdy aktivace serin/threoninové kinázy Raf má za následek celou fosforylační kaskádu vedoucí k aktivaci serin/threonin specifické protein kinázy ERK1 a ERK2. Aktivovaný protein Erk má pleiotropní účinky a hraje významnou úlohu při kontrole exprese molekul, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy, diferenciace a migraci buněk. Tato kináza fosforyluje serin 69 (hlavní fosforylační místo) na Bim_{EL}, čímž inhibuje aktivitu této izoformy, jelikož fosforylovaný Bim_{EL} podléhá rychlé proteazomové degradaci (Luciano *et al.*, 2003; Marani *et al.*, 2004; Stang *et al.*, 2009). Jiná studie ukázala, že pokud je v buňkách zablokována funkce proteasomů (proteasomálním inhibitorem MG132), nedochází k degradaci isoformy Bim_{EL} (Westerberg *et al.*, 2012).

Fosforylace proteinu Bim nemusí ovšem být pouze inhibiční, ale také aktivační. To zajišťuje kináza JNK („Jun N-terminal kinase“), která je aktivována, je-li buňka vystavena stresovým faktorům z prostředí jako je například UV záření. Fosforylace proteinu Bim touto kinázou vede k zesílení pro-apoptotického účinku tohoto proteinu u buněk ledvin a neuronů (Lei and Davis, 2003; Putcha *et al.*, 2003).

Protein Bim je většinou považovaný za pro-apoptotický protein z rodiny Bcl-2 proteinů, jelikož přispívá k oligomerizaci proteinů Bax a Bak na mitochondriích. Ovšem ve studii (Gogada *et al.*, 2012) je protein Bim prezentován jako molekula s možnou rolí podporující přežívání epiteliálních nádorových buněk. Porovnáním množství proteinu Bim u nádorových buněk prostaty a prsu s nenádorovými buňkami se zjistilo, že u obou typů nádorových buněk je zvýšená exprese proteinu Bim, zatímco u normálních buněk se jej téměř nepodařilo detekovat. V nádorových buňkách se vyskytovaly všechny 3 izoformy proteinu Bim (nejvýrazněji izoforma Bim_{EL}). Zvýšená exprese tohoto proteinu byla zprostředkována mechanismem závislým na transkripčním faktoru E2F1, který se váže do vazebných míst

promotorové oblasti genu Bim. Těchto vazebných míst bylo *in silico* analýzou identifikováno osm (Gogada *et al.*, 2012).

3.2.1.2 Noxa

Lidský protein Noxa se skládá z 54 aminokyselin a obsahuje jednu doménu BH3 nezbytnou pro jeho správnou funkci ve srovnání s myším proteinem Noxa, který obsahuje dvě domény BH3. Identifikace domény BH3 vedla k zařazení tohoto proteinu mezi pro-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2. V literatuře ho můžeme nalézt také pod názvem PMAIP1 („Phorbol-12-myristat-13-acetat-indukovaný protein 1“) a je kódován genem PMAIP1 na chromozomu 18q21, skládá se ze 3 exonů, ovšem transkript obsahuje pouze sekvence exonu 1 a exonu 3 (Hijikata *et al.*, 1990; Oda *et al.*, 2000; Wang and Sun, 2008).

Protein Noxa je důležitým mediátorem apoptózy zprostředkované nádorovým supresorovým proteinem p53, který reaguje na poškození DNA. Zpočátku se předpokládalo, že množství proteinu Noxa je primárně regulováno proteinem p53, ovšem později byla prokázána indukce proteinu Noxa i bez účasti tohoto nádorového supresoru (Oda *et al.*, 2000; Yakovlev *et al.*, 2004). Bylo popsáno více mechanismů nezávislých na proteinu p53, jakými jsou například regulace pomocí transkripčního faktoru HIF1 („hypoxia-inducible factor“), E2F1 nebo také indukce exprese proteinu Noxa UV zářením (Hershko and Ginsberg, 2004; Kim *et al.*, 2004; Kim and Koh, 2011).

Pro-apoptotická funkce tohoto proteinu spočívá v přímé inhibici anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2, díky čemuž může dojít k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a aktivaci kaspázy -9. Ve srovnání s proteinem Bim, který má schopnost vázat se s většinou anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2, protein Noxa selektivně inhibuje zejména protein Mcl-1, který je následně degradován proteasomem, a také protein A1 (Chen *et al.*, 2005). Blokace proteinu Mcl-1 proteinem Noxa je významná i během kombinovaného působení inhibitorů ABT-737 (inhibitor aktivity Bcl-2, Bcl-X_L a Bcl-w) a SMI-4A (inhibitor kinázy Pim) na nádorové linie prostaty. SMI-4A indukuje zvýšení množství proteinu Noxa spolu s poklesem množství proteinu Mcl-1. Kombinace inhibitorů SMI-4A a ABT-737 může překonat rezistenci nádorových buněk prostaty k apoptóze zvýšenou expresí proteinu Noxa (jak *in vitro*, tak *in vivo*) (Song and Kraft, 2012).

Vzhledem k tomu, že se oba proteiny Bim i Noxa váží s proteinem Mcl-1, byla zkoumána jejich možná spolupráce či soutěžení. Působením apoptotických podnětů jako je UV záření, dochází ke zvýšené expresi proteinu Noxa, který je schopný vytěsnit protein Bim

z vazebného místa proteinu Mcl-1, a tím dochází ke zvýšení depolarizace mitochondriální membrány u nádorové linie HCT116 (Han *et al.*, 2007). Zároveň může být protein Noxa funkčně doplněn proteinem Bad, který inhibuje proteiny Bcl-2, Bcl-X_L a Bcl-w, a v případě zvýšené exprese obou těchto proteinů dochází k účinné indukci apoptózy bez pomoci dalších pro-apoptotických proteinů Bcl-2 rodiny (Chen *et al.*, 2005).

Zvýšená exprese tohoto proteinu je spojená s pokročilejšími stádii nádorového onemocnění prostaty (nejvyšší množství proteinu Noxa bylo detekováno u hormonálně refrakterního karcinomu prostaty) (Diallo *et al.*, 2007). Protein Noxa hraje roli i u myších embryonálních fibroblastů při apoptóze indukované inhibitory proteazomu. Působení inhibitoru proteazomu indukuje (jak na úrovni proteinu, tak na úrovni mRNA) zvýšené množství proteinu Noxa. Ukázalo se, že množství tohoto proteinu je ovlivňováno působením kinázy JNK, která má tři isoformy (JNK1, JNK2 a JNK3). Působení JNK1 výrazně urychluje expresi proteinu Noxa a následnou apoptózu myších embryonálních fibroblastů, zatímco JNK2 má opačnou funkci (ve srovnání s JNK1) – v přítomnosti této kinázy je exprese proteinu Noxa a následná apoptóza silně narušena (Pietkiewicz *et al.*, 2013).

Při kombinované léčbě představuje protein Noxa významnou cílovou molekulu. Použitím léčiv jako jsou doxorubicin a vinkristin v kombinaci s kyselinou betulínovou, která při samostatném podání účinkují nezávisle na proteinu Noxa, došlo k apoptóze zprostředkované právě tímto proteinem u nádorové linie Jurkat. Z toho důvodu by mohl mít protein Noxa důležitou roli v regulaci citlivosti k apoptóze při využití polychemoterapie a dalších metod léčby (Ehrhardt *et al.*, 2012).

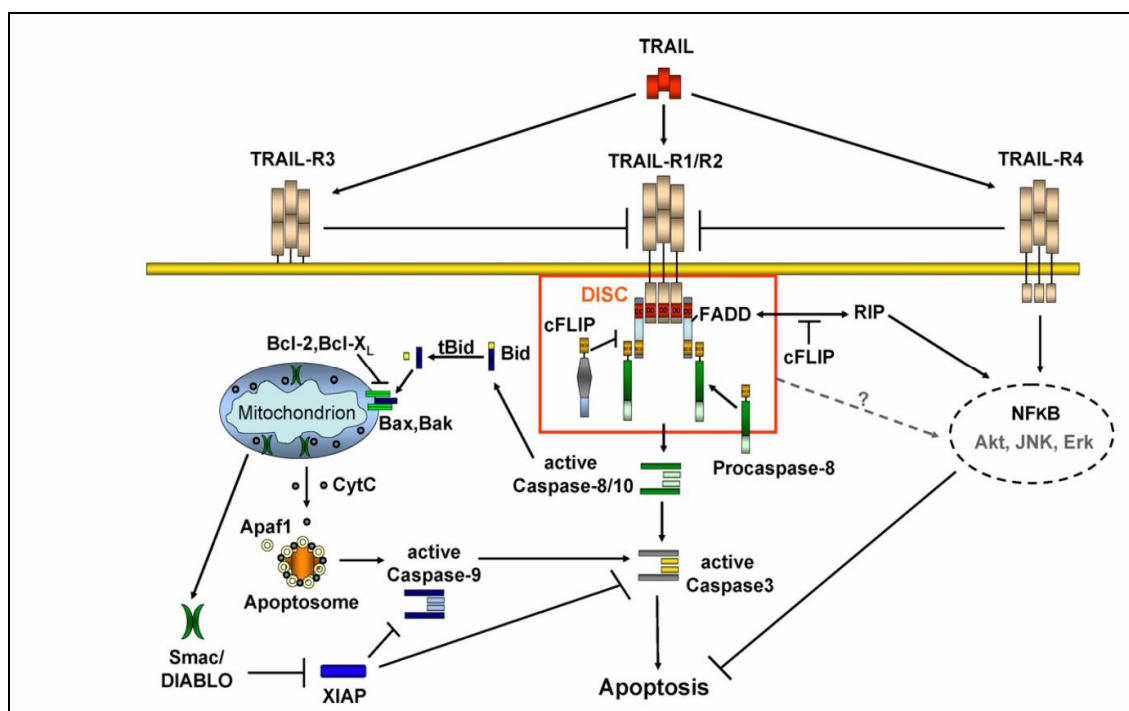
3.3 TRAIL

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, APO-2 ligand) je zajímavý cytokin, který je intenzivně studován díky své unikátní schopnosti indukovat apoptózu u mnoha typů nádorových buněk (včetně nádorových buněk prostaty), ale nikoli u zdravých buněk v organismu. TRAIL byl indentifikován v roce 1995 a 1996 na základě jeho sekvenční podobnosti se členy rodiny TNF, nezávisle na sobě dvěma výzkumnými skupinami (Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996). Stejně jako další ligandy patřící do rodiny ligandů TNF se TRAIL uplatňuje v regulaci proliferace, apoptózy a celé řady biologických procesů v organismu.

Existuje 5 různých receptorů pro TRAIL – DR4 (TRAIL-R1, APO-2), DR5 (TRAILR2, TRICK, Killer), DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) a osteoprotegerin.

K indukci apoptotického signálu je nutná vazba TRAILu k receptorům smrti na povrchu buňky. Receptory smrti obsahují intracelulární doménu smrti (DD, „death domain“), pomocí které může dojít ke spuštění apoptózy indukované TRAIlem. Po vazbě TRAILu k receptorům DR4 nebo DR5 následuje trimerizace receptoru a tvoří se signální komplex DISC („death-inducing signalling complex“). Do DISCu se váže adaptérový protein FADD („Fas-Associated Death Domain“), na který se přes efektorovou doménu smrti DED („Death Effector Domain“) připojuje iniciační prokaspáza -8 (nebo prokaspáza -10), které jsou v DISCu aktivovány (Salvesen and Dixit, 1999; Kimberley and Screaton, 2004). S ohledem na průběh apoptózy indukované TRAIlem rozeznáváme buňky dvojího typu. U buněk typu I aktivní kaspáza -8 přímo štěpí prokaspázu -3, zatímco buňky typu II vyžadují amplifikaci apoptotického signálu přes mitochondrie. Posílení apoptotického signálu je zajištěno štěpením proteinu Bid aktivní kaspázou -8 a následnou translokací tBid do mitochondrií. Tímto způsobem dochází ke spuštění mitochondriální dráhy apoptózy (Metkar *et al.*, 2003).

Ukázalo se, že řada nádorových buněk je rezistentní k působení TRAILu. Inhibice apoptózy indukované TRAIlem by mohla vést k omezení využití TRAILu v protinádorové terapii, proto je snaha o objasnění řady úrovní mechanismů rezistence. Apoptóza indukovaná TRAIlem může být oslabena například vazbou TRAILu k DcR1 nebo DcR2 (nedochází k přenosu apoptotického signálu), vazbou proteinu c-FLIP („cellular FLICE-inhibitory protein“) do komplexu DISC místo kaspázy -8, proteiny z rodiny Bcl-2 (účinek zmíněn v předchozí kapitole), cIAP („inhibitor of apoptosis protein) inhibující kaspázovou aktivitu, nebo PI3K/Akt drahou, která může fosforylovat řadu pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 a kaspázu -9, blokáci štěpení proteinu Bid nebo zvýšenou expresí proteinů rodiny cIAP a proteinu cFLIP (Obr. 5) (Falschlehner *et al.*, 2007).



Obr. 5 Signalizační dráha apoptózy indukované TRAILem a možné mechanismy inhibice této dráhy. Převzato z Falschlehner (2007).

3.4 Chemoterapie

U řady nádorových onemocnění se stala chemoterapie standardní léčbou, která má za cíl eliminaci nádorových buněk z organismu a inhibici buněčné proliferace. Jelikož současné možnosti terapie jsou omezené v důsledku vznikající rezistence a vysoké toxicity léčby, je velkou snahou vyhledání nových přístupů, které by vedly k překonání rezistence nádorových buněk. Jednou z možností může být použití kombinace látek, které by vedly k efektivnější a selektivnější léčbě, se současným snížením vedlejších účinků u pacienta prostřednictvím interakce signálních drah těchto látek. Jedním z vhodných kandidátů pro kombinovanou léčbu je cytokin TRAIL spolu s chemoterapeutickou látkou (cytostatikem), mající za následek posílení apoptózy. V níže uvedeném textu se zabývám účinky chemoterapeutik na bázi platiny, jako je cisplatina (CDDP) nebo její derivát (LA-12).

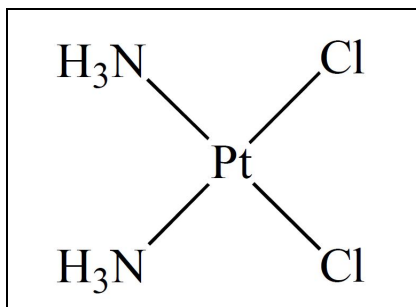
3.4.1 Platinové chemoterapeutické látky

Platinové chemoterapeutické látky jsou důležitou skupinou látek běžně používaných v klinické praxi u pacientů s nádorovým onemocněním. Na bázi platinových sloučenin existuje celá řada léčiv. V současné době jsou Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleny tři platinové komplexy a to karboplatina, oxaliplatina a CDDP.

Všechny tři výše jmenované látky se nachází v oxidačním stavu II a jedná se o cis-isomery, jelikož trans-isomery jsou zpravidla inaktivní, a jsou podávány intravenózně. Z důvodu, že spektrum nádorů citlivých k platinovým komplexům je omezené (a to i díky sekundárním rezistencím), byly vyvinuty nové platinové deriváty s oxidačním číslem IV jako je například satraplatina, LA-12 a další. Významnou výhodou těchto látek, kromě překonání rezistence k platinovým cytostatikům s oxidačním číslem II, je jejich možné podání perorální cestou, použití v nižších koncentracích a mírnější vedlejší účinky (Boulikas and Vougiouka, 2003; Wang, 2010)

3.4.1.1 Cisplatina (cis-diamminedichlorplatinum (II))

CDDP patří mezi účinné chemoterapeutické látky používané běžně v terapii nádorových onemocnění a působí na DNA jako bifunkční alkylační činidlo (Obr. 6). Jedná se o planární molekulu, jejíž léčebný potenciál byl náhodně objeven fyzikem a biologem Barnettem Rosenbergem v roce 1969, kdy byla pozorována inhibice dělení bakteriálních buněk (Rosenberg *et al.*, 1965; Rosenberg *et al.*, 1969). Limitujícím faktorem tohoto preparátu je ovšem jeho toxicita (a to zejména nefrotoxicita a neurotoxicita) spolu s možným získáním rezistence u původně citlivých nádorových buněk (Thompson *et al.*, 1984; Loh *et al.*, 1992).



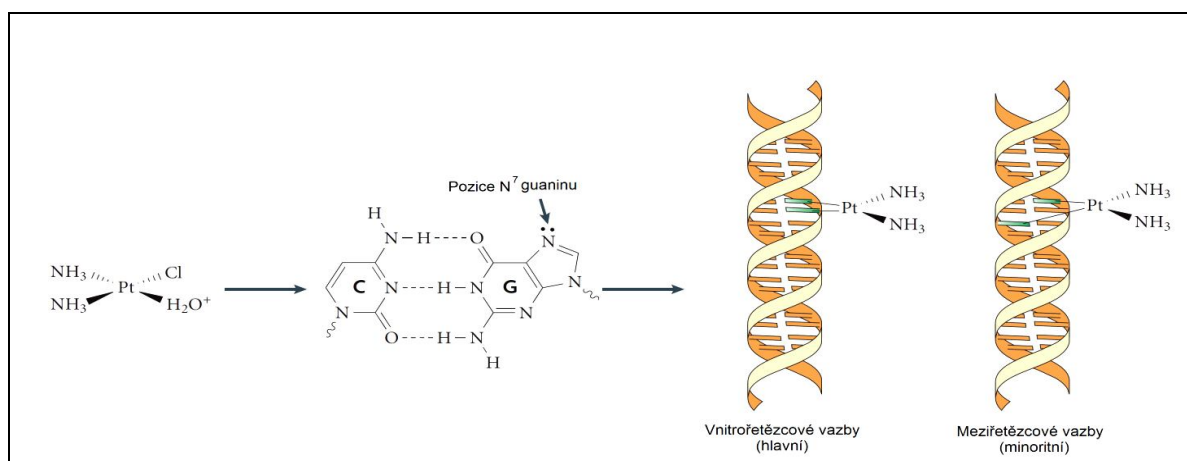
Obr. 6 Chemická struktura CDDP. Převzato z Wang (2010)

3.4.1.1.1 Mechanismus působení CDDP

Důležitým mechanismem působení CDDP je její vazba k DNA a vznik platinových DNA aduktů, jelikož jaderná DNA je považována za jeden z důležitých cílů tohoto léčiva. CDDP vstupuje do buňky aktivním nebo pasivním transportem. Díky nízké intracelulární koncentraci chloridových iontů reaguje CDDP s vodou. To vede k substituci chloru a vzniku reaktivní kladně nabitě molekuly, která je schopná vázat se k záporně nabitým molekulám DNA a tvořit různé typy platinových DNA aduktů (monoadukty, intermolekulární adukty, meziřetězcové a vnitřetězcové vazby), které blokují replikaci a transkripci, což může vést k

zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi a následně k opravě nebo smrti nádorové buňky (Kozubik *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2007). CDDP způsobuje přibližně 60-65% vnitrořetězcových vazeb GG, 25-30% AG, 5-10% GNG, 1-3% meziřetězcových vazeb diaduktů GG, a také dochází k tvorbě Pt-DNA aduktů spolu s proteiny (Obr. 7) (Chaney *et al.*, 2004). Cytotoxicitu způsobuje rozpoznání poškozené DNA pomocí proteinů, které aktivují signály pro přežití a pro-apoptotické signály určující další osud buňky. Nejčastěji se CDDP s DNA váže v místě N7 guaninu (Foltinová *et al.*, 2008).

V dalších studiích bylo ukázáno, že CDDP je schopná také indukovat apoptózu nezávisle na poškození jaderné DNA. Příkladem může být aktivace stresové dráhy přes endoplazmatické retikulum (Mandic *et al.*, 2003) nebo cytotoxický efekt CDDP zprostředkován z velké části přímým působením na mitochondrie. CDDP velmi ochotně tvoří s mitochondriální DNA adukty, což má za následek rychlé uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následnou možnou apoptózu buňky (Yang *et al.*, 2006).



Obr. 7 Zjednodušená ukázka vazby CDDP na DNA. Upraveno podle Kelland (2007).

Poškozením DNA může dojít ke změnám průběhu různých signálních drah zapojujících se do procesů regulace buněčné smrti. Týká se to zejména dráhy zahrnující p53, a kinázy jako JNK, ERK, ATR („ataxia telangiectasia and Rad3 related“)/ATM („ataxia telangiectasia mutated“), Chk1 („checkpoint kinase 1“)/Chk2 („checkpoint kinase 2“) (Banin *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2002; Hamdi *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2010). Například nádorový supresorový protein p53 se podílí na buněčné odpovědi při poškození DNA (regulací buněčného cyklu, buněčné smrti a reparace DNA) prostřednictvím transkripční aktivace cílových genů, mezi které patří protein Bax, p21, AIP1 („Actin-interacting protein 1“), Noxa a další. Závažné poškození DNA vede k tomu, že protein p53 indukuje apoptózu. Ovšem protein p53 je mutovaný u 50% všech nádorových onemocnění a buněčné linie, které

postrádají funkční protein p53, jsou často výrazně rezistentnější k CDDP než linie s nemutovaným proteinem p53 (Fajac *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1998; Mandic *et al.*, 2003).

Pro cytotoxický účinek CDDP může být důležitá dráha ERK a změny v této dráze mohou výrazně ovlivnit výsledek působení CDDP na nádorové buňky. Kináza ERK hraje významnou úlohu v regulaci buněčného růstu a diferenciaci a je indukována jako odpověď na růstové faktory, cytokiny a také za podmínek stresu. CDDP může aktivovat kinázu ERK v závislosti na čase, dávce a typu buněk. Použitím inhibitoru dráhy ERK dochází k inhibici apoptózy indukované CDDP zejména přes mitochondriální dráhu, což naznačuje možnou korelaci mezi aktivací ERK a citlivostí HeLa buněk k CDDP (Wang *et al.*, 2000; Schweyer *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Nicméně tento fenomén není obecně platný, jelikož u některých nádorových linií nedochází při inhibici ERK dráhy ke snížení citlivosti buněk k apoptóze indukované CDDP a také některé buněčné linie vykazují velmi nízkou aktivitu ERK (Hayakawa *et al.*, 1999; Persons *et al.*, 1999). Aktivita ERK a buněčná odpověď na CDDP může záviset na individuálním buněčném kontextu a stupni stresu (Hernandez Losa *et al.*, 2003; Mandic *et al.*, 2003).

Působením CDDP může také dojít k aktivaci kináz JNK a p38, což je doprovázeno zvýšenou aktivací proteinu AP-1 („activator protein 1“) a c-Jun a indukcí exprese FasL. Doba trvání aktivace JNK a p38 má zásadní význam pro rozhodnutí buňky, zda-li dojde k apoptóze nebo k přežití. U nádorových buněk ovariálního karcinomu citlivých k CDDP dochází k aktivaci JNK a p38 po delší dobu (8-12 hodin), než je tomu v případě buněk rezistentních k CDDP (1-3 hodiny) (Kaina *et al.*, 1997; Mansouri *et al.*, 2003; Brozovic *et al.*, 2004).

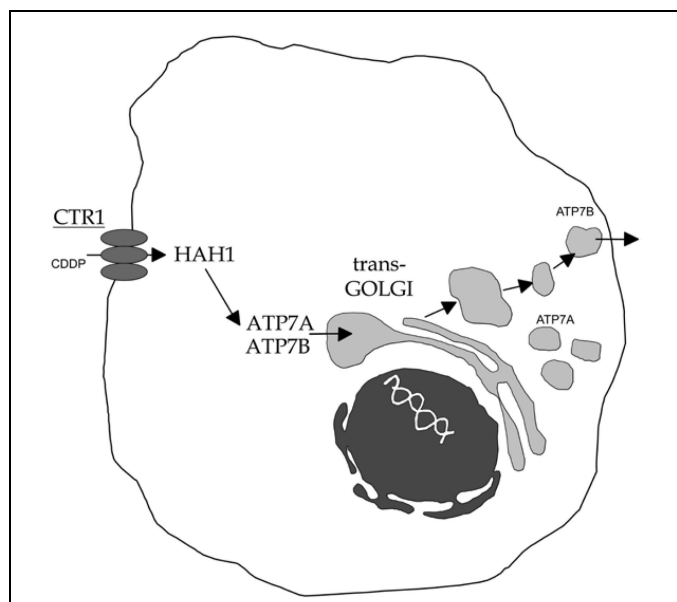
3.4.1.1.2 Možné mechanismy rezistence buněk k CDDP

Díky studiím zabývajícím se působením CDDP bylo možné objasnit zatím pouze některé z mechanismů způsobující rezistenci k tomuto chemoterapeutiku. Mezi ně patří zejména inaktivace CDDP vazbou na jiné komponenty buňky než je DNA, účinnější oprava DNA (případně rozsáhlejší tolerance k poškození DNA) nebo limitace množství CDDP v buňce omezeným příjmem nebo zvýšeným aktivním odčerpáváním této látky z buňky.

DNA je sice považována za jeden z hlavních biologických cílů působení CDDP, ovšem pouze 1% CDDP reaguje s jadernou DNA, jelikož CDDP ochotně reaguje i s jinými buněčnými složkami jako jsou sloučeniny obsahující thiol (glutathion, cystein nebo methionin) za vzniku nefunkčních metabolitů, které jsou z buňky odstraněny. Tím dochází

z velké části k inaktivaci CDDP a k ovlivnění jejího cytotoxického účinku (Kondo *et al.*, 1995; Perez, 1998; Sadowitz *et al.*, 2002).

Důležitým faktorem pro působení CDDP je její akumulace v buňce. Ukazuje se, že příjem i vylučování tohoto chemoterapeutika do a z buňky může souviset s regulací koncentrace mědi v buňce. Mezi významné proteiny účastníci se efluxního transportu mědi patří proteiny ATP7A (ATPasa, Cu^{2+} transporter, alfa polypeptid) a ATP7B (ATPasa, Cu^{2+} transporter, beta polypeptid) (Obr. 8). Zatímco exprese proteinu ATP7A byla detekována jen u omezeného spektra zdravých buněk, zvýšené množství ATP7A bylo popsáno u řady typů nádorových buněk plic, pankreasu nebo kolonu (Samimi *et al.*, 2003). U některých buněčných linií léčených CDDP může tento protein zprostředkovat uzavření CDDP do vezikulů s následnou detoxifikací buněk. K rezistenci k CDDP může také docházet při zvýšené expresi ATP7B, jako je tomu u nádorové linie prostaty PC-5 (Komatsu *et al.*, 2000).



Obr. 8 Schématické zobrazení transportu CDDP v buňce. Převzato z Foltinová (2008)

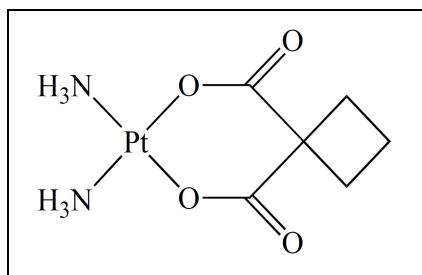
Pro buňku je velmi důležitá možnost reparace DNA, což zajišťuje celá řada různých opravných mechanismů. U platinových DNA aduktů využívá buňka nejčastěji mechanismus nukleotidové excizní reparace NER („nucleotide excision repair“). Jedná se o proces, kdy dochází k rozpoznání poškozené DNA multiproteinovým komplexem, vystřížení krátké sekvence obsahující defektní DNA a následnému zaplnění mezery DNA polymerázou. NER je zároveň důležitým mechanismem způsobující rezistenci nádorových buněk k účinku CDDP (Reardon *et al.*, 1999). Pokud je zabráněno rozpoznání cisplatinových DNA aduktů mechanismem NER, může dojít ke spuštění apoptózy (Huang *et al.*, 1994). Ukazuje se, že deregulace na úrovni NER (poškození systému NER) mohou významně zvýšit citlivost

nádorových buněk prostaty (DU-145 a PC-3) a kolonu k apoptóze indukované CDDP nezávisle na funkčním stavu proteinu p53 nebo MMR (oprava chybného párování nukleotidů viz. níže) (Stubbert *et al.*, 2010).

Dalším mechanismem je oprava chybného párování nukleotidů MMR („mismatch repair“). Funkce MMR proteinů je spojena s modulací citlivosti nádorových buněk k CDDP. Tyto proteiny slouží jako detektory CDDP-DNA aduktů, a při defektu v MMR jsou nádorové buňky kolonu a ovariálního karcinomu zvýšeně rezistentní k účinkům CDDP (Fink *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1997; Vaisman *et al.*, 1998). V případě, že má buňka funkční MMR systém, dochází v průběhu procesu apoptotické odpovědi k aktivaci JNK a tyrosin kinázy c-Abl. Obě tyto složky jsou součástí apoptotické dráhy závislé na MMR, která přispívá k cytotoxickému působení CDDP, z toho důvodu jsou nádorové buňky s defektním MMR mechanismem zvýšeně rezistentní k apoptóze indukované CDDP (Nehme *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1999; Nehme *et al.*, 1999; Oniscu *et al.*, 2004). Součástí MMR systému je několik proteinů mezi které patří i MSH3 („MutS homolog 3“). Na isogenním klonu nádorových buněk kolonu HCT116, u kterých byla exprese MSH3 selektivně regulována Tet-off systémem, se ukázalo, že nádorové buňky postrádající protein MSH3 jsou více citlivé k CDDP. To by mohlo být vysvětleno sníženou schopností těchto buněk opravovat dvouřetězcové zlomy DNA, které vznikly působením CDDP (Takahashi *et al.*, 2011).

3.4.1.2 Karboplatina (cis-diammin-cyklobutan-1,1-dikarboxylátplatnatý komplex)

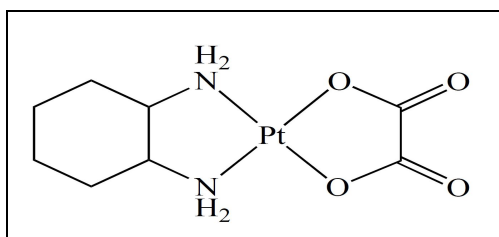
Karboplatina patří mezi druhou generaci platnatých komplexů a mechanismus biologické aktivace je podobný jako u cisplatiny, ovšem aktivace molekuly probíhá pomaleji (Obr. 9). Ve srovnání s cisplatinou je méně nefrotoxická, ovšem velkým nedostatkem je vznik myelosuprese (útlum krvetvorby). Tato látka se používá k léčbě nádorů vaječníků a malobuněčného karcinomu plic (Knox *et al.*, 1986; Kelland, 2007). Zároveň se ukazuje, že léčba nádorového onemocnění prostaty kombinovanou terapií zahrnující karboplatinu by mohla mít významnou klinickou účinnost s přijatelnou toxicitou (Kikuno *et al.*, 2007; Kentepozidis *et al.*, 2012).



Obr. 9 Chemická struktura karboplatiny. Převzato z Wang (2010).

3.4.1.3 Oxaliplatina (1R,2R-diammin-cyklohexan-oxalátplatnatý komplex)

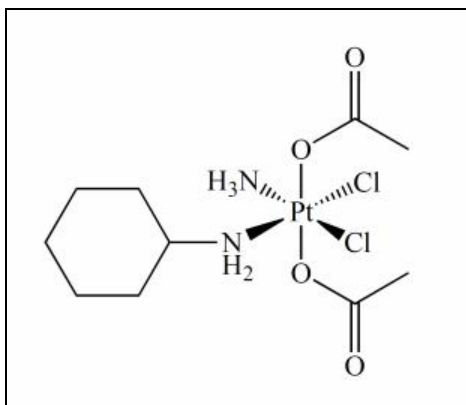
Oxaliplatina je látka, která získala široké uplatnění při léčbě kolorektálního karcinomu a je aktivní i u nádorových linií, které jsou rezistentní k CDDP (Obr. 10). Spolu s karboplatinou se řadí mezi druhou generaci platnatých komplexů. Ve srovnání s CDDP a karboplatinou je oxaliplatina díky svému ligandu více lipofilní, což může přispívat k její celkové toxicitě. Přestože se DNA adukty váží na stejných místech s DNA jako CDDP a karboplatina, tak z důvodu jiné chemické struktury jsou oxaliplatinové DNA adutky buňkou odlišně zpracovány. Oxaliplatina často nevykazuje zkříženou rezistenci s CDDP a karboplatinou. Zároveň je méně neforotoxická a jejím omezením je mírná hematotoxicita a periferní sensorická neuropatie. Pro výrazně lepší účinnost se tato látka podává v kombinaci s leukovorinem a 5-fluorouracilem (tato kombinace je známá pod názvem FOLFOX), kdy dochází k významnému opoždění progresu metastáz karcinomu tlustého střeva a zvýšenému počtu přežívajících pacientů (Raymond *et al.*, 1998; Misset *et al.*, 2000; Wang, 2010). Ukazuje se, že při léčbě hormonálně refrakterního karcinomu prostaty může být oxaliplatina v kombinaci s 5-fluorouracilem účinným prostředkem léčby (Misset *et al.*, 2000; Droz *et al.*, 2003). Oxaliplatina by mohla mít význam i u vzácné formy nádorového onemocnění SRCC („signet-ring cell carcinoma“) prostaty s kostními metastázami (jedná se o extrémně vzácné onemocnění se špatnou prognózou). Zdá se, že kombinace FOLFOX spolu s cetuximabem by mohla být slibnou variantou léčby tohoto onemocnění (Roldan *et al.*, 2012).



Obr. 10 Chemická struktura oxaliplatiny. Převzato z Wang (2010)

3.4.1.4 Satraplatina (JM216)

Satraplatina je jedním z nových platinových derivátů s oxidačním číslem IV, s dobrými klinickými atributy a jedinečná v tom, že obsahuje stabilní ligandy, které jsou asymetrické (Obr. 11). Jedná se o první platinové cytostatikum umožňující perorální podání, také má mírnější toxické účinky (nedochází k významné neuropatii a nefropatii spojené s léčbou) a je aktivní i u nádorů neodpovídajících na terapii platinovými léčivy jakými je CDDP. Tato látka je studována u širokého spektra solidních nádorů a od první poloviny 90. let 20. století je v klinickém testování. Výzkum byl zaměřen na léčbu pacientů s pokročilým karcinomem prostaty, u kterých selhala předchozí chemoterapie. Platinové deriváty s oxidačním číslem IV mají odlišný způsob aktivace. V krvi je satraplatina (JM216) redukována na dvojmocnou formu, a tento aktivní metabolit (JM118) funguje podobně jako cisplatina – tvoří s DNA adukty, které nejsou rozpoznávány reparačními proteiny pro chybné párování bazí a dochází k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi s následnou apoptózou buňky (Oh *et al.*, 2007; Wosikowski *et al.*, 2007; Wang, 2010). Jak satraplatina, tak její metabolit JM118 mají schopnost překonat jak vnitřní tak získanou rezistenci k CDDP, ovšem satraplatina je schopna vytvářet platinové DNA adukty v menší míře než její metabolit JM118 (Fokkema *et al.*, 2002).



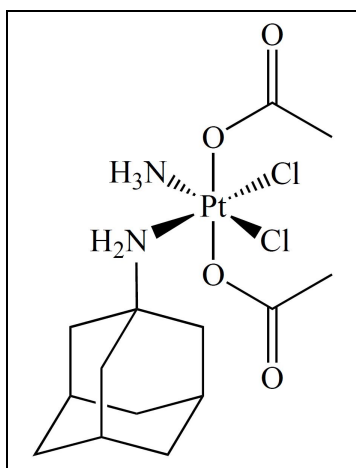
Obr. 11 Chemická struktura satraplatiny. Převzato z Wang (2010)

3.4.1.5 LA-12

((OC-6-43)-bis(acetato)-(1-adamantylamin)-ammin-dichloroplatičitý komplex)

LA-12 byla poprvé popsána a syntetizována v roce 2004 profesorem Žákem a kolektivem (Obr. 12). Jedná se o lipofilní čtyřmocný platinový derivát, obsahující velký hydrofóbní ligand adamantylamin, který poskytuje této sloučenině jedinečné vlastnosti, jakými je stabilita a snadnější vstup do buňky, což přispívá k lepší akumulaci této látky v buňce (Zak *et al.*, 2004). LA-12 má dobrou rozpustnost a je možná její perorální aplikace.

Byla prokázána vyšší protinádorová účinnost této látky, spolu se schopností překonání rezistence k cisplatině u řady nádorových linií (Zak *et al.*, 2004; Kozubik *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2006; Svihalkova-Sindlerova *et al.*, 2010; Sova *et al.*, 2011). Zároveň byla na myších s implantovanými lidskými nádorovými buňkami prostaty (PC-3) zjištěna vyšší cytotoxická účinnost LA-12 ve srovnání s účinností satraplatiny, a při *in vivo* studiích (na myších a prasatech) nebyly pozorovány vážné nežádoucí účinky (Cermanova *et al.*, 2004; Sova *et al.*, 2005; Sova *et al.*, 2006). Z výše zmíněných důvodů představuje platinový derivát LA-12 slibnou variantu léčiva.



Obr. 12 Chemická struktura LA-12. Převzato z Wang (2010).

3.4.1.5.1 Mechanismus působení LA-12

LA-12 vykazuje vyšší cytotoxicitu ve srovnání s CDDP, což může být mimo jiné i důsledek snížené účinnosti nukleotidové excizní reparace spolu s akumulací LA-12 v buňkách. Bylo prokázáno, že po působení LA-12 přechodně narůstá množství buněk v S nebo G2/M fázi buněčného cyklu, zatímco účinkem CDDP dochází hlavně k zástavě buněčného cyklu v G2 fázi (Kozubik *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2006). Současně se ukazuje, že pro-apoptotický účinek je pravděpodobně nezávislý na proteinu p53, jelikož LA-12 aktivuje apoptotickou dráhu i u nádorových buněk s deficientním nebo mutantním proteinem p53 (Horvath *et al.*, 2007; Roubalova *et al.*, 2010).

Kromě působení látky LA-12 na DNA byla prokázána i její vazba s chaperony. Klíčovým chaperonem nádorových buněk je Hsp90 se schopností stabilizace některých molekul, které jsou cílem protinádorové terapie. Inhibiční efekt LA-12 na Hsp90 má za následek degradaci proteinů jako je cyklin D1, mutovaný p53 nebo estrogenový receptor. Působení kombinace těchto mechanismů (poškození DNA spolu s inhibicí Hsp90) může také podpořit vyšší protinádorovou účinnost LA-12 ve srovnání s CDDP (Kvardova *et al.*, 2010).

Zajímavé je, že byl také identifikován marker, který by mohl sloužit pro sledování průběhu a odpovědi na léčbu pomocí LA-12. Tím je vazebný protein pro retinol RB4 („retinol-binding protein 4“). Jedná se o důležitý protein v cytoplazmě, zapojený v transportu retinolu, který významně ovlivňuje buněčnou diferenciaci (defekt metabolismu retinolu můžeme najít u mnoha nádorových onemocnění). Bylo ukázáno, že LA-12 je schopná indukovat expresi RB4, což může hrát významnou roli pro obnovení signální dráhy indukované retinolem (Bouchal *et al.*, 2011).

3.4.1.6 Platinové chemoterapeutické látky u nádorového onemocnění prostaty

Terapie nádorového onemocnění prostaty je závislá především na stádiu tohoto onemocnění. Standardní léčbou zejména metastazujícího hormonálně refrakterního karcinomu prostaty je v současné době použití docetaxelu spolu s prednisonem, ovšem s omezenou účinností. Samotná aplikace platinových chemoterapeutik obvykle není dostačující pro kompletní eliminaci nádorů prostaty, i když byla například pozorována aktivita karboplatiny u jedinců, u kterých došlo k progresi po působení docetaxelu (Oh *et al.*, 2007). Také se ukazuje možné uplatnění platinových chemoterapeutik při léčbě vzácných forem nádorových onemocnění prostaty (Ciszewski *et al.*, 2008; Roldan *et al.*, 2012). Kombinovaná terapie (platinová chemoterapeutická látka spolu s další účinnou látkou) má ve srovnání s aplikací samostatných platinových látek mnohem větší budoucnost pro léčbu nádorů prostaty a touto problematikou se zabývám ve své diplomové práci.

3.5 Kombinovaná terapie

Jak je výše zmíněno, kombinovaná terapie se ukazuje jako vhodný přístup pro překonání rezistence ke stávající léčbě spolu s posílením apoptotického účinku. Toho je docíleno možnou interakcí signálních drah účinných látek na mnoha úrovních v buňce, což bylo prokázáno i u nádorového onemocnění prostaty.

Různé nádorové buňky jsou odlišně citlivé k chemoterapeutické léčbě. Proto je třeba dále zkoumat přesný účinek kombinované léčby TRAILu s chemoterapeutickou látkou u různých nádorových buněčných linií, jelikož kombinovaná terapie může zvýšit citlivost některých nádorových buněk k apoptóze, snížit nutné množství používané látky a nežádoucí účinky v klinické praxi.

3.5.1 Možné mechanismy působení kombinované terapie

Velké množství vědeckých prací je zaměřeno na zkoumání mechanismů zcitlivění nádorových buněk k apoptóze indukované TRAILem a byla popsána řada látek schopných posílit cytotoxické účinky tohoto cytokinu. V navazujícím textu se zabývám zejména účinky cytokinu TRAILu v kombinaci s platinovými chemoterapeutickými látkami (CDDP, karboplatina, oxaliplatina a LA-12).

3.5.1.1 CDDP a TRAIL

Je možné, že zcitlivění buněk k apoptóze indukované TRAILem pomocí CDDP je zprostředkováno z části inhibicí transkripčního represoru YY1 („Yin Yang 1“), který je spojený s negativní transkripční regulací DR5 (na promotoru DR5 bylo nalezeno možné vazebné místo pro transkripční faktor YY1 a umlčení transkripčního faktoru YY1 pomocí siRNA vede ke zvýšené expresi DR5). Zdá se, že posílení exprese DR5 může být výsledkem inhibice DNA vazebné aktivity YY1, vyvolané pravděpodobně inhibičním působením CDDP na NF- κ B („Nuclear factor κ B“), který je schopný indukovat expresi anti-apoptotických proteinů. Kombinovaná terapie pomocí TRAILu a CDDP (včetně dalších léčiv) vede k synergickému účinku a k významnému posílení apoptózy u nádorové linie PC-3 (Baritaki *et al.*, 2007). Jelikož působení CDDP má za následek zvýšenou expresi DR5 a zároveň snížení množství proteinu c-FLIP, zajišťuje tak obnovení apoptózy indukované TRAILem také u nádorových buněk glioblastomu (zhoubné nádorové onemocnění mozku). Buňky glioblastomu jsou k účinkům TRAILu rezistentní z důvodu nedostatečné exprese povrchových receptorů smrti (DR4 a DR5) a zvýšené exprese intracelulárního proteinu c-FLIP (kompetitivní inhibitor kaspázy-8) a CDDP může vést ke zcitlivění těchto buněk k apoptóze indukované TRAILem (Ding *et al.*, 2011).

Cisplatina také zcitlivuje linie PC-3 a DU-145 k apoptóze indukované lexatumumabem (monoklonální protilátka proti DR5), prostřednictvím posílení vnější i vnitřní dráhy apoptózy. Kombinace lexatumumabu spolu s cisplatinou významně aktivuje iniciační kaspázu -8, -9 a efektorovou kaspázu -6 a -3. Kombinace těchto látek má synergický účinek u mnoha nádorových linií, které byly při samostatném použití těchto látek rezistentní k apoptóze. K indukci apoptózy jsou dostačující nízké koncentrace lexatumumabu a subtoxická koncentrace cisplatin (Wu and Kakehi, 2009). Podobný účinek cisplatin v kombinaci s TRAILem byl prokázán i u linie LNCaP (Munshi *et al.*, 2002). Množství

kaspázy -8 indukované CDDP je také zásadní pro zcitlivění buněk ovariálního karcinomu k TRAILu (Duiker *et al.*, 2011).

Nádorové linie prostaty nezávislé na androgenech (mezi které patří například linie DU-145 a PC-3) jsou charakterizované jako odolné vůči chemoterapeutickým látkám a apoptóze. Použitím XIAP inhibitoru (specifické morpholino oligonukleotidy) v kombinaci s CDDP nebo TRAIlem dochází u linie DU-145 k posílení apoptózy. Tyto výsledky ukazují, že by inhibice exprese XIAP mohla mít velký terapeutický význam pro zcitlivění nádorových buněk k apoptóze indukované TRAIlem a/nebo CDDP (Amantana *et al.*, 2004). Úloha proteinu XIAP v modulaci apoptózy indukované CDDP/TRAIlem byla pozorována i u nádorových buněk děložního hrdla, které je často spjato s infekcí lidským papilloma virem HPV (human papilloma virus), který kóduje onkoproteiny E6 (poškozuje v buňkách protein p53) a E7 (narušuje protein Rb). Suprese E6 pomocí siRNA částečně obnovuje funkci p53. Za těchto podmínek nedochází k výraznému posílení apoptózy nádorových buněk, ale nádorové buňky se stávají náchylnými k CDDP. CDDP v kombinaci s TRAIlem (ve srovnání s látkami samostatnými) výrazně posiluje aktivaci kaspázy -8 a -3, se současným snížením množství proteinu XIAP u buněk cervikálního karcinomu, které měly z části obnovenou funkci proteinu p53 (Tan *et al.*, 2012).

3.5.1.2 Karboplatina a TRAIL

Srovnáním účinků karboplatiny a CDDP u nádorové linie HeLa (nádorové buňky děložního hrdla) v kombinaci s TRAIlem se ukázalo, že působením CDDP (jak samostatně tak v kombinaci s TRAIlem) nedochází k výraznému snížení viability nádorových buněk jako tomu bylo v případě karboplatiny. To by mohlo souviset s indukcí apoptózy přes mitochondriální dráhu, jelikož aplikací karboplatiny dochází ke štěpení proteinu Bid kaspázou -8, což ovšem nebylo pozorováno v případě použití CDDP. Karboplatina posiluje apoptózu indukovanou TRAIlem a tato látka by mohla být dobrou variantou pro kombinovanou léčbu nádorového onemocnění děložního hrdla (Han *et al.*, 2009).

Rovněž použití kombinace Mapatumumabu (specifická monoklonální protilátka proti DR4) spolu s karboplatinou a paclitaxelem by mohla mít velký klinický přínos, jelikož nebyly pozorovány farmakokinetické interakce mezi léky a byla posílena protinádorová činnost u pacientů se solidními nádory (jako je například pokročilý malobuněčný karcinom plic) (Leong *et al.*, 2009).

Ukazuje se, že karboplatina má schopnost indukovat expresi DR5. Zvýšená exprese DR5 po působení karboplatiny je důležitá pro posílení citlivosti buněk ovariálního karcinomu k apoptóze indukované TRAILem. Kombinace karboplatiny spolu s aplikací AD5-10 (monoklonální protilátka proti DR5) zvyšuje cytotoxický účinek u buněk ovariálního karcinomu, které jsou rezistentní k TRAILu. V přítomnosti AD5-10 má zvýšené množství DR5 za následek posílení buněčné smrti závislé na kaspázách. Pro optimální působení těchto látek je vhodné zapojení buněk imunitního systému. Byla pozorována pravděpodobná souvislost mezi imunologickým dohledem NK buněk (exprimujících TRAIL v nádoru) a aktivací apoptózy indukované přes DR5, jelikož deplece NK buněk z nádorového ložiska v myši vede k mohutnějšímu růstu nádoru. Zvýšená exprese DR5 působením karboplatiny v přítomnosti NK buněk exprimujících TRAIL je ideálním prostředím pro vysoce efektivní indukci apoptózy AD5-10 protilátkou (El-Gazzar *et al.*, 2010).

V současné době není prozkoumán účinek kombinované terapie TRAILu spolu s karboplatinou u nádorového onemocnění prostaty. Z toho důvodu lze pouze předpokládat, že by mohlo docházet k podobnému působení kombinace TRAILu a karboplatiny jako je tomu u nádorového onemocnění děložního hrdla nebo ovariálního karcinomu.

3.5.1.3 Oxaliplatina a TRAIL

Podobně jako tomu bylo v předchozím případě, aktuálně není dostatečné množství literatury, která se zabývá působením oxaliplatiny spolu s TRAILem u nádorových buněk prostaty. Většina informací o účinku této kombinace na nádorové buňky byla proto získána ze studií vypracovaných na odlišných typech nádorů.

U linií kolorektálního karcinomu oxaliplatina významně posiluje apoptózu indukovanou rekombinantním TRAILem. Tento účinek není závislý na proteinu p53 nebo změně exprese receptorů pro TRAIL, ale dochází ke snížení exprese proteinu c-FLIP. Ukazuje se, že c-FLIP (zejména jeho dlouhá forma) hraje rozhodující roli v regulaci citlivosti buněk kolorektálního karcinomu k TRAILu a chemoterapii (Galligan *et al.*, 2005). Mechanismus pomocí kterého oxaliplatina zvyšuje účinnost TRAILu může být také aktivací N-terminální c-Jun kinázy. Tato kináza má schopnost fosforylovat anti-apoptotický protein Bcl-X_L. Fosforylace Bcl-X_L narušuje jeho schopnost inhibovat pro-apoptotický protein Bax, díky čemuž může dojít k oligomerizaci Bax/Bak proteinů a k indukci mitochondriální dráhy apoptózy (El Fajoui *et al.*, 2011). Jeden z dalších mechanismů působení oxaliplatiny v kombinaci s TRAILem může být posílení aktivace kaspáz, zprostředkované zvýšenou aktivací proteinu Bid u buněčné linie HeLa (Köhler *et al.*, 2008). Také bylo prokázáno, že u

osteosarkomových buněk má kombinace TRAILu a oxaliplatiny za následek významné posílení apoptózy ve srovnání s použitím samostatných látek. Oxaliplatina zvyšuje citlivost nádorové linie OS-732 k apoptóze indukované TRAIlem snížením exprese proteinu Mcl-1 (Huang *et al.*, 2012).

3.5.1.4 LA-12 a TRAIL

Ukázalo se, že působením cisplatiny a LA-12 dochází k relokizaci receptorů smrti DR4 a DR5 do lipidových raftů a po kombinovaném působení s TRAIlem navíc ke zvýšené stimulaci kaspáz a zrychlené internalizaci TRAILu. Tento jev byl pozorován u nádorové linie prostaty PC-3 a nádorové linie kolonu HCT-116, které byly vystavena subtoxickým účinkům LA-12, a také CDDP. Zajímavé je, že LA-12 byla použita ve významně nižších koncentracích ve srovnání s CDDP, což naznačuje velký terapeutický potenciál této látky při budoucí léčbě nádorových onemocnění (Vondálová Blanářova *et al.*, 2011). V současné době se problematikou týkající se mechanismů působení LA-12 v kombinaci s TRAIlem zabývá pouze výše zmíněný článek a ukazuje, že by LA-12 mohla mít značný pozitivní vliv na terapii nádorových onemocnění. Z toho důvodu je má diplomová práce zaměřena na molekulární mechanismy zodpovědné za regulaci apoptózy nádorových buněk prostaty po působení TRAILu a platinových chemoterapeutických látek CDDP a LA-12.

4 Materiál a metody

4.1 Charakterizace použitých buněčných linií a jejich kultivace

Pro experimenty *in vitro* byly použity tři lidské epiteliální nádorové linie prostaty (LNCaP, DU-145 a PC-3). Linie LNCaP pochází z metastázy z lymfatické uzliny a je závislá na androgenech. Mezi nádorové linie nezávislé na androgenech se řadí DU-145, pocházející z metastázy mozku, a PC-3 původem z kostní metastázy. Kultivace buněčných linií DU-145 a LNCaP probíhala v médiu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) s přidavkem 1% antibiotik penicilinu a streptomycinu (Duchefa Biochemie B. V., 100 mg/l) a 10 % fetálního bovinního séra (PAA, GmbH, Rakousko). Buněčná linie PC-3 byla kultivována v médiu F12 (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) opět s přidavkem 1% antibiotik (penicilin/streptomycin) a 10% fetálního bovinního séra (stejného původu jako u předchozích linií).

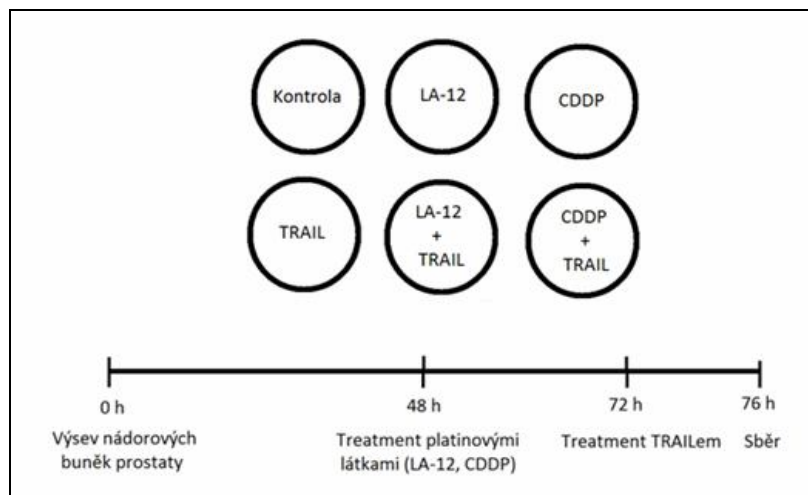
Kultivace buněk probíhala v inkubátoru při teplotě 37°C, 95% vlhkosti a 5% atmosféře CO₂, v plastových kultivačních lahvích (TPP, Trasadigen, Švýcarsko) a pro experimenty byly buňky vysévány na Petriho misky (TPP) v množství 20 000 buněk/cm². Buněčné linie DU-145 a PC-3 byly pasážovány 2x týdně, linie LNCaP byla pasážována 1x týdně a jednou týdně bylo u těchto buněk vyměněno médium.

Během přípravy na výsev experimentu byly adherentní buňky opláchnuty roztokem PBS/EDTA (fosfátový pufr/kyselina ethylendiamintetraoctová) a uvolněny pomocí trypsinu (0,05 % trypsin / 0,02 % EDTA; PAN Biotech, GmbH). Zastavení působení trypsinu bylo provedeno přidáním média se sérem a počet buněk byl stanoven pomocí CASY Cell Counter (Roche, Praha, ČR). Tento přístroj vyhodnotil také viabilitu buněčné suspenze.

4.2 Uspořádání experimentů

K buňkám vysetých v Petriho miskách (20 000 buněk/cm²) byly po 48 hodinové kultivaci přidány platinové látky (CDDP a LA-12). Po jejich 24 hodinovém působení byly buňky dále ovlivněny cytokinem TRAIL po dobu 4 hodin. Následně proběhl sběr buněk a příprava vzorků na další analýzy (Obr. 13). Toto uspořádání bylo využito ve většině experimentů.

V některých případech byly sledovány časově (1, 2, 4, 8, 12 a 24 hodin) a koncentračně (CDDP 10; 20; 30 μM, LA-12 0,5; 1; 1,5 μM) závislé účinky samostatných platinových látek CDDP a LA-12.



Obr. 13 Schéma experimentu

4.3 Použité chemikálie

V experimentech byly používány platinové chemoterapeutické látky CDDP (Sigma-Aldrich) a LA-12 (Dr. P. Sova, Platinum Pharmaceuticals, a.s., Brno, Česká Republika), a lidský rekombinantní TRAIL (Dr. L. Anděra, ÚMG AV ČR Praha, Česká Republika). CDDP a LA-12 byly aplikovány v různých koncentracích (viz. konkrétní experimenty) a jejich roztoky byly nachystány vždy čerstvé – rozpuštěním v DMSO (dimethylsulfoxid). TRAIL byl naředěn a uchován (-80°C nebo -20°C) v pufru [(20 nM HEPES (4-(2-hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonová kyselina), 0,3 M NaCl, 1 % sacharóza, 0,05 % Tween 20 (polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurat), 1 mM DTT (1,4-dithiothreitol)]. Použité koncentrace výše zmíněných látek byly zvoleny s ohledem na předchozí zkušenosti na Oddělení cytokinetiky, BFÚ AV ČR v Brně, údajů z literatury a vlastních předběžných výsledků. Koncentrace použité u jednotlivých nádorových buněčných linií jsou uvedeny v tabulce číslo 1. Kontrolní vzorky byly ovlivněny pouze rozpouštědly daných chemikálií a maximální použitá koncentrace DMSO při kultivaci buněk nepřesáhla 0,05% v médiu.

Látka	Buněčná linie		
	DU-145	LNCaP	PC-3
CDDP (μM)	5	5	10, 20, 30
LA-12 (μM)	1	2,5	0,5;1;1,5
TRAIL (ng/ml)	5	20	5

Tab. č. 1 Použité koncentrace jednotlivých látek u buněčných linií. Tučně jsou zvýrazněny koncentrace vybrané jako nejvhodnější pro experimentální práci.

4.4 Příprava buněčných lyzátů a kvantifikace proteinů ve vzorcích

Celý proces sběru buněk byl realizován na ledu. Nejdříve byly plovoucí buňky s médiem přeneseny do nachystané zkumavky. Adherentní buňky byly opláchnuty PBS a uvolněny od pokladu pomocí plastové škrabky (v přítomnosti PBS) nebo trypsinizací. Suspenze obsahující původní plovoucí i přisedlé buňky byla centrifugována (200g, 4°C, po dobu 5 minut, Centaur, MSE, UK). K buněčnému peletu byla přidána lyzační směs. [*Lyzační směs*: lyzační pufr (1% SDS – sodium dodecyl sulfát, 10% glycerol, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4) + 1% směs inhibitorů proteáz PIM (Protease Inhibitor Mix G, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)]

Pro detekci fosforylovaných proteinů byly sbírány pouze adherentní buňky. Po odstranění média s plovoucími buňkami byly přisedlé buňky opláchnuty fosfátovým pufrům PBS. Poté byla k buňkám přidána lyzační směs a lyzát byl přenesen do zkumavky o objemu 1,5 ml. [*Lyzační směs*: lyzačního pufru (1% SDS – sodium dodecyl sulfát, 10% glycerol, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4) + 1% směs inhibitorů proteáz PIM (Protease Inhibitor Mix G, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) + 200 mM NaF (fluorid sodný, Fluka, Praha, ČR) + 200 mM Na₃VO₄ (orthovanadát sodný, Fluka, Praha, ČR)]

Lyzační směs působila na vzorky po dobu 10 minut na ledu, následně byly vzorky inkubovány 10 minut při 90°C, zchlazeny na ledu, zcentrifugovány (Centaur, MSE, UK) a sonikovány (Sonifier® B-12, Branson Ultrasonic Corp., Danbury, CT, USA). Pomocí sady DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) byla stanovena koncentrace proteinů a poté byly vzorky naředěny na stejnou koncentraci lyzačním pufrům. Nakonec byl ke vzorkům přidán 1 % β -mercaptoetanol a 0,01 % bromfenolová modř.

4.5 Elektroforetická separace proteinů, westernový přenos a imunodetekce

Separace proteinů byla uskutečněna pomocí gelové elektroforézy na 12% nebo 15% polyakrylamidových gelech (MQ voda; Tris+EDTA pH 8,8 a pH 6,8; akrylamid:bisakrylamid 37,5:1; N,N,N,N – tetramethylethylendiamid TEMED; amonium persulfát) o tloušťce 1,5 mm ve vertikální elektroforetické jednotce (Hoefer, Holliston, MAS, USA). Elektroforetická separace probíhala při laboratorní teplotě, napětí 140 V, po dobu přibližně 2 hodin.

Metodou Western blot byly proteiny přeneseny na PVDF membránu (Pall Corporation, USA), a před tímto krokem byla membrána aktivována methanolem. Přenos proteinů probíhal při teplotě 4°C, proud 400 A, po dobu jedné hodiny v pufru (250 mM Tris; 1,92 M glycin, 20% methanolu). Poté byla membrána blokována v 5% odtučněném mléce naředěném oplachovacím pufrem (150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 20 mM Tris pH=7,6 doplněno destilovanou vodou a pH upraveno na 7,2). Po zablokování v 5% mléce byla membrána třikrát promyta oplachovacím pufrem po dobu 10 minut. V této fázi byla membrána připravena pro inkubaci s primární protilátkou, která probíhala přes noc ve 4°C. Následující den byly membrány opět třikrát promyty oplachovacím pufrem po dobu 10 minut a inkubovány v sekundární protilátce s konjugovanou křenovou peroxidázou při laboratorní teplotě 1 hodinu. Sekundární protilátky byly proti králičím IgG (Amersham NA934, 1:3000), myším IgG (Amersham NA931, 1:3000) a kozím IgG 1:1000 (Sigma Aldrich A5420, 1:1000) dle protilátky primární. Seznam použitých primárních je uveden v tabulce číslo 2.

Po inkubaci se sekundární protilátkou byly membrány opět promyty oplachovacím pufrem a následovala detekce proteinů chemiluminiscenční soupravou Milipore (Milipore Corp., Billerica, USA). V konečné fázi byly membrány exponovány na rentgenovém filmu (AGFA Gevaert N. V., Belgie). Vyvolání filmů bylo provedeno v přístroji Curix 60 (Agfa HealthCare CZECH s.r.o.). Pro ověření nanášení stejného množství proteinů ve vzorcích (při elektroforetické separaci) byl detekován protein β -aktin.

Protein	Primární protilátka (dodavatel, katalogové číslo)	Ředění	Původ (Kozí = G, Králíčí = R, Myší = M)	Použité rozpouštědlo (mléko nebo BSA v promývacím pufru)
Bad	Becton Dickinson Company B31420	1:500	M	5% BSA
Bak	Cell Signaling 3792	1:500	R	5% BSA
Bax	Cell Signaling 2772	1:1000	R	5% BSA
Bcl-x _L	Cell Signaling 2762	1:1000	R	2,5% mléko
Bid	Cell signaling 2002	1:1000	R	5% BSA
Bim	Cell Signaling 2933	1:1000	R	5% BSA
DcR1	BD Pharmingen 550622	1:500	R	5% mléko
DcR2	BD Pharmingen 559648	1:1000	R	5% mléko
DR4	Sigma Aldrich D3813	1:500	R	5% mléko
DR5	Sigma Aldrich D3938	1:500	R	5% mléko
ERK	Cell Signaling 9102	1:1000	R	5% BSA
Štěpená kaspáza 3	Cell Signaling 9661	1:500	R	5% mléko
Kaspáza 8	Cell Signaling 9746	1:1000	M	5% BSA
Kaspáza 9	Cell Signaling 9508	1:500	M	2,5% mléko
Kaspáza 10	MBL M059-3	1:500	M	5% mléko
cIAP1	Cell Signaling 4952	1:1000	R	5% BSA
cIAP2	Santa Cruz 7944	1:1000	R	5% BSA
Lamin B	Santa Cruz 6217	1:1000	G	5% BSA
Mcl-1	Sigma Aldrich M8434	1:3000	R	5% mléko
Noxa	Calbiochem OP180	1:500	M	5% BSA
P38	Cell Signaling 9212	1:1000	R	5% BSA

Protein	Primární protilátka (dodavatel, katalogové číslo)	Ředění	Původ (Kozí = G, Králíčí = R, Myší = M)	Použité rozpouštědlo (mléko nebo BSA v promývacím pufru)
PARP	Santa Cruz 7150	1:1000	R	5% mléko
Puma	Cell Signaling 4976	1:500	R	5% BSA
XIAP	Cell Signaling 2042S	1:500	R	5% BSA
β-aktin	Sigma Aldrich A5441	1:5000	M	5% mléko
<i>Fosforylované proteiny:</i>				
pERK	Cell Signaling 9101	1:1000	Králík	5% BSA
pp38	Cell signaling 9211	1:3000	Králík	2,5% mléko

Tab.č.2 Seznam použitých primárních protilátek

4.6 Detekce apoptózy pomocí protilátky M30 CytoDEATH

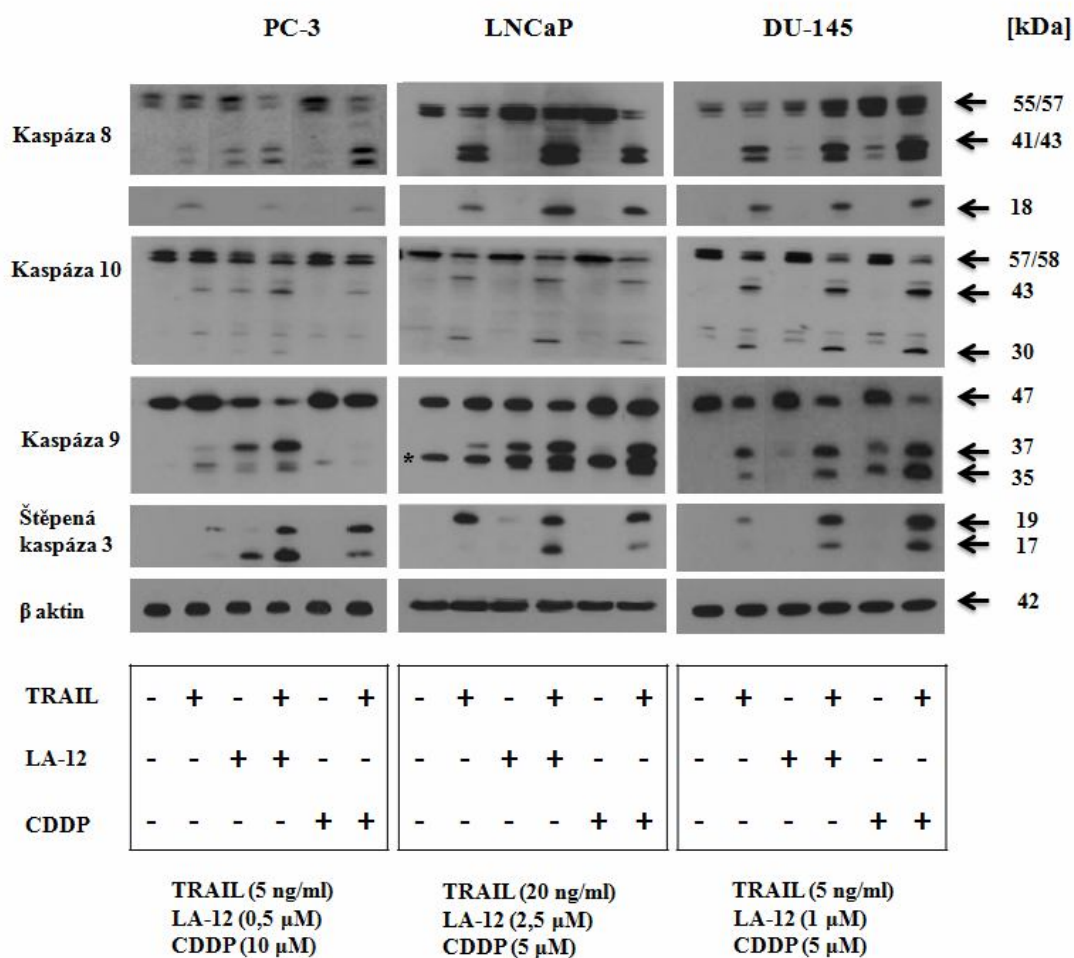
M30 cytoDEATH (Roche) je monoklonální myší protilátka pro detekci apoptózy lidských epiteliálních buněk. Umožňuje detekci cytokeratinu 18, který je štěpen zejména kaspázou -3. Buňky, které byly sesbírány (pomocí trypsinizace) tak, aby nedošlo k jejich poškození, byly promyty v PBS a fixovány v 0,5 ml methanolu po dobu 30 minut při -15 až -25 °C. Po fixaci byly buňky 2x opláchnuty promývacím pufrům (PBS obsahující 0,1% Tween 20) a k buněčnému peletu byla přidána protilátka M30 CytoDEATH (1:500), která byla ředěna v inkubačním pufru (PBS obsahující 0,1% Tween 20 a 1% BSA). Vzorky byly inkubovány s protilátkou ve tmě 1 hodinu. Následně byly buňky 2x opláchnuty promývacím pufrům a pelety byly v malém objemu promývacího pufru resuspendovány. Takto připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru (FACSCalibur, Becton Dickinson), hodnoceny v programu CellQuest a výsledky byly vyjádřeny jako procento buněk se štěpeným cytokeratinem 18.

5 Výsledky

V rámci diplomové práce byly sledovány účinky TRAILu, CDDP a LA-12 jak samostatně, tak při kombinovaném působení (LA-12 + TRAIL, CDDP + TRAIL) u nádorových buněčných linií prostaty PC-3, LNCaP a DU-145, zejména s ohledem na možné posílení apoptózy a změny množství/aktivace vybraných molekul s potenciální úlohou v regulaci tohoto procesu. Buňky byly preinkubovány chemoterapeutickými látkami (LA-12 nebo CDDP) po dobu 24 hodin a následně ovlivněny cytokinem TRAIlem po dobu 4 hodin.

5.1 Posílení aktivace kaspáz kombinovaným působením TRAILu a CDDP/ LA-12

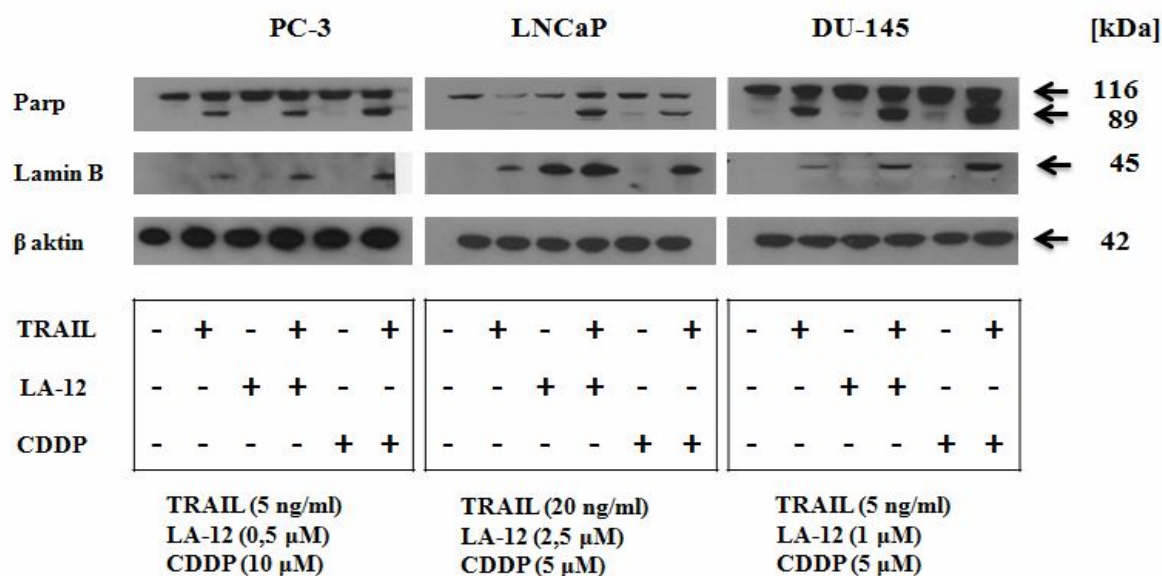
U nádorových buněčných linií PC-3, LNCaP a DU-145 docházelo k výraznému posílení aktivace kaspáz (-3, -8 a -9) po kombinovaném působení TRAILu a LA-12/CDDP, ve srovnání se samostatnou aplikací těchto látek. Štěpení kaspáz (-3, -8 a -9) nastává již působením samostatného TRAILu, ovšem ve významně menší míře ve srovnání s kombinovaným působením látek. Štěpení kaspázy -9 indikuje aktivaci mitochondriální dráhu. U prokaspázy -10 (58/57 kDa) nebyl pozorován významný rozdíl v množství štěpených fragmentů (43/30 kDa) po působení TRAILu ve srovnání s kombinovaným působením látek (Obr. 14).



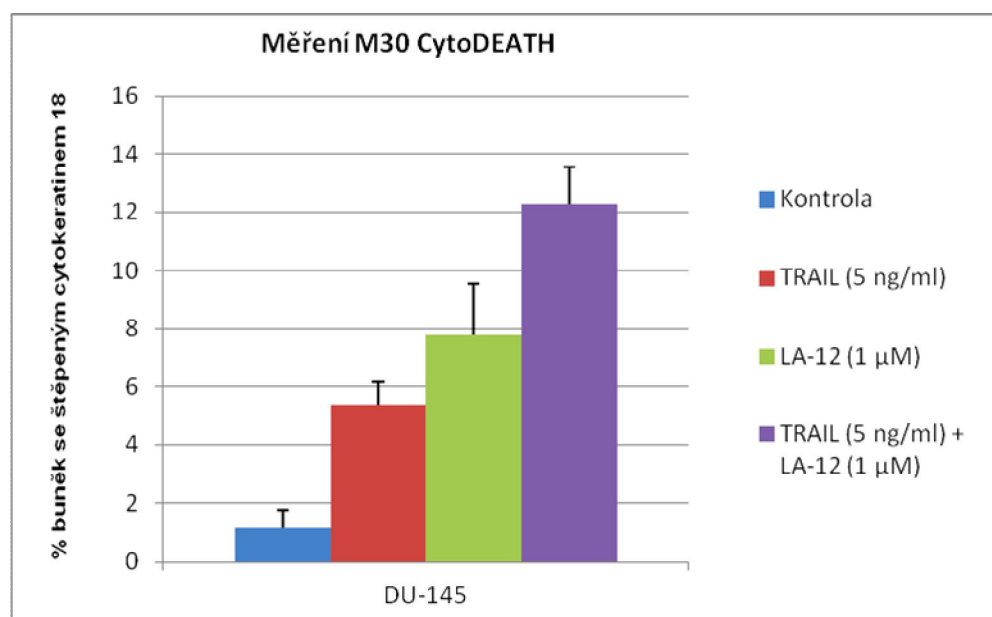
Obr. 14 Štěpení kaspáz (-8, -10, -9, -3) u buněk PC-3, LNCaP a DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAIlem (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifických protilátek). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu. (* nespecifický band)

5.2 Zvýšené štěpení substrátů kaspáz po kombinovaném působení TRAILu a CDDP/LA-12

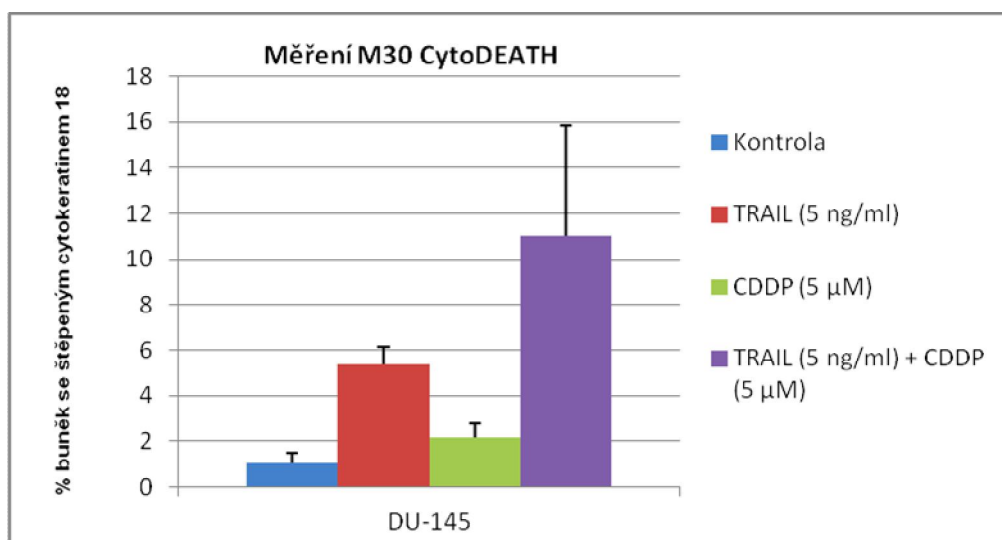
Kombinované působení chemoterapeutických látek (LA-12 nebo CDDP) spolu s TRAIlem vedlo u nádorových buněčných linií prostaty (PC-3, LNCaP a DU-145) k účinnějšímu štěpení proteinů PARP (fragment o velikosti 89 kDa), lamin B (fragment o velikosti 45 kDa) a cytokeratin 18 ve srovnání s působením látek samostatných (Obr. 15, 16, 17). Tento efekt byl nejzřetelnější u nádorové linie DU-145. Výsledky korelují s efekty TRAILu a chemoterapeutických látek (LA-12 a CDDP) s ohledem na štěpení kaspáz (Obr. 14).



Obr. 15 Štěpení proteinů PARP a lamin B u buněk PC-3, LNCaP a DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAIlem (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifických protilátek). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.



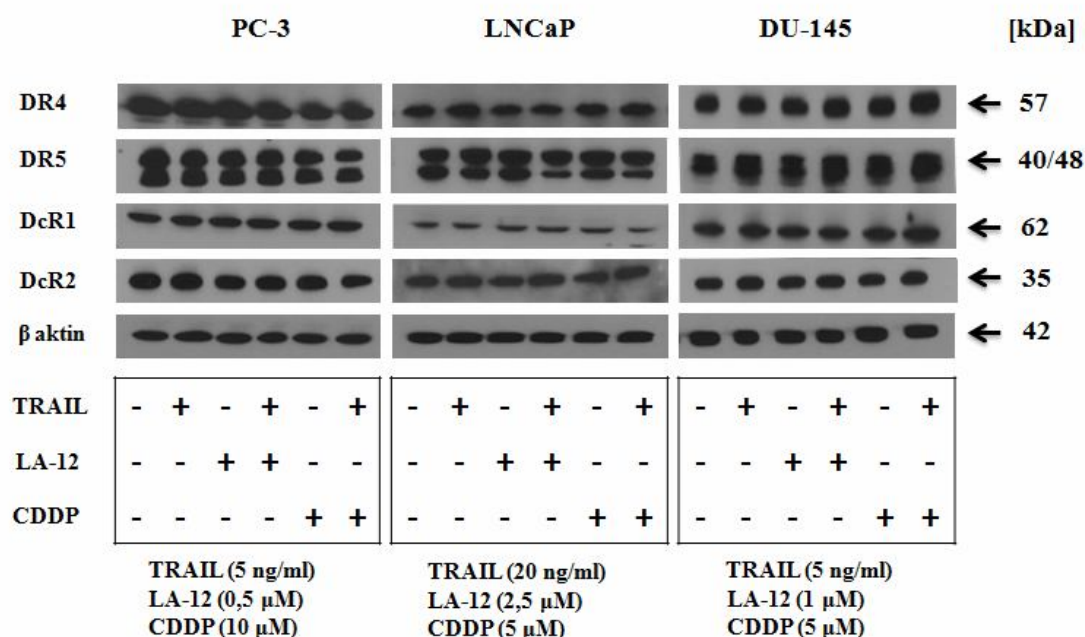
Obr. 16 Štěpení proteinu cytokeratin 18 u buněk DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 a následně inkubovaných (4 h) s TRAIlem (průtoková cytometrie, imunodetekce pomocí specifické protilátky M30 cytoDEAT). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují průměr + směrodatnou odchylku ze tří nezávislých opakování experimentu.



Obr. 17 Štěpení proteinu cytokeratin 18 u buněk DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAILe (průtoková cytometrie, imunodetekce pomocí specifické protilátky M30 cytoDEATH). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují průměr + směrodatnou odchylku ze tří nezávislých opakování experimentu.

5.3 Celkové množství receptorů pro TRAIL po kombinovaném působení TRAILu a CDDP/LA-12

Z předchozích výsledků je zřejmé, že při kombinovaném působení TRAILu spolu s platinovými chemoterapeutickými látkami dochází k významnému posílení apoptózy. Zajímalo nás, zda by tyto účinky mohly být doprovázeny změnami celkového množství receptorů pro TRAIL po působení LA-12 nebo CDDP. Výsledky ukázaly, že tyto látky samostatně ani v kombinaci s TRAILe výrazně neovlivňují celkové množství DR4, DR5, DcR1 a DcR2 u všech tří studovaných linií (Obr. 18).



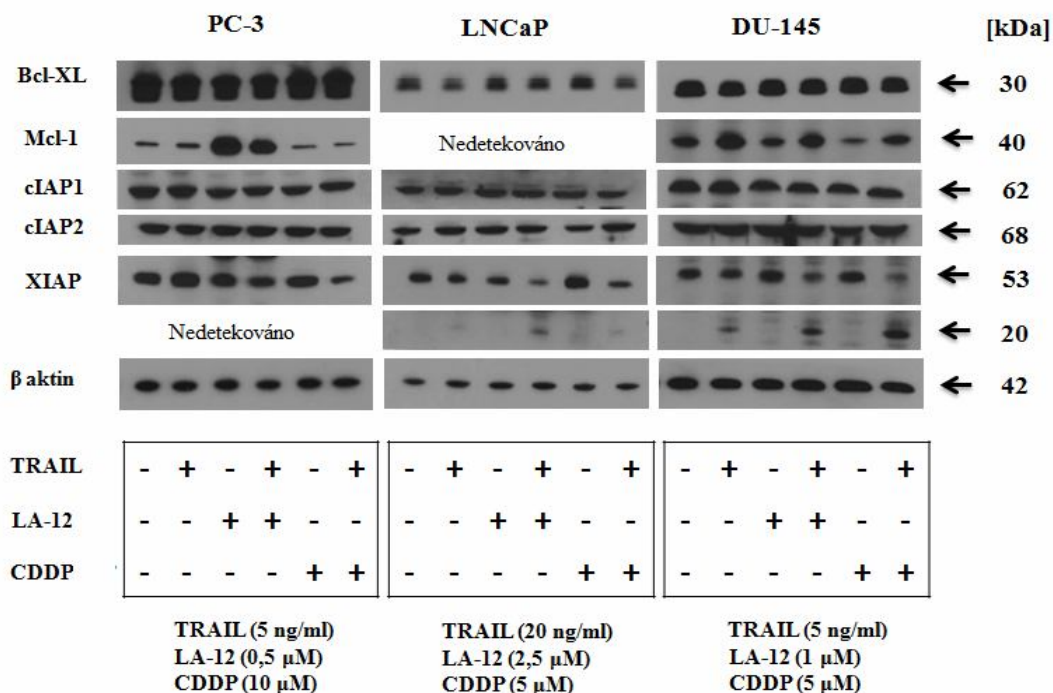
Obr. 18 Celkové množství proteinů - receptorů pro TRAIL (DR4, DR5, DcR1, DcR2) u buněk PC-3, LNCaP a DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAIlem (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifických protilátek). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.

5.4 Změny množství vybraných anti-apoptotických proteinů působením TRAILu a CDDP/LA-12

Následkem kombinovaného působení TRAILu spolu s chemoterapeutickými látkami (LA-12, CDDP) nedocházelo k významným změnám v množství proteinů cIAP1 a cIAP2, byl však detekován zřetelný úbytek množství celkového proteinu XIAP. U nádorové linie DU-145 a LNCaP můžeme vidět tento jev i po působení samostatného TRAILu, ovšem s nižší účinností, než je tomu v případě kombinací látek. Zároveň byl u těchto dvou linií identifikován fragment proteinu XIAP (o velikosti přibližně 20 kDa), korelující s úbytkem množství celkové formy tohoto proteinu po působení uvedených kombinací látek (Obr. 17).

Zatímco kombinace chemoterapeutických látek (LA-12, CDDP) a TRAILu neměla vliv na množství proteinů Bcl-XL u všech tří sledovaných linií, poněkud heterogenní odpověď byla pozorována s ohledem na změny množství proteinu Mcl-1.

U nádorové linie PC-3 se zvýšilo množství proteinu Mcl-1 po působení platinové látky LA-12 i její kombinace s TRAIlem, naopak u linie DU-145 měla inkubace s LA-12/CDDP za následek pokles množství tohoto proteinu. Samotný TRAIL pak množství proteinu Mcl-1 mírně zvyšoval (Obr. 19). U linie LNCaP tento protein nebyl detekován.

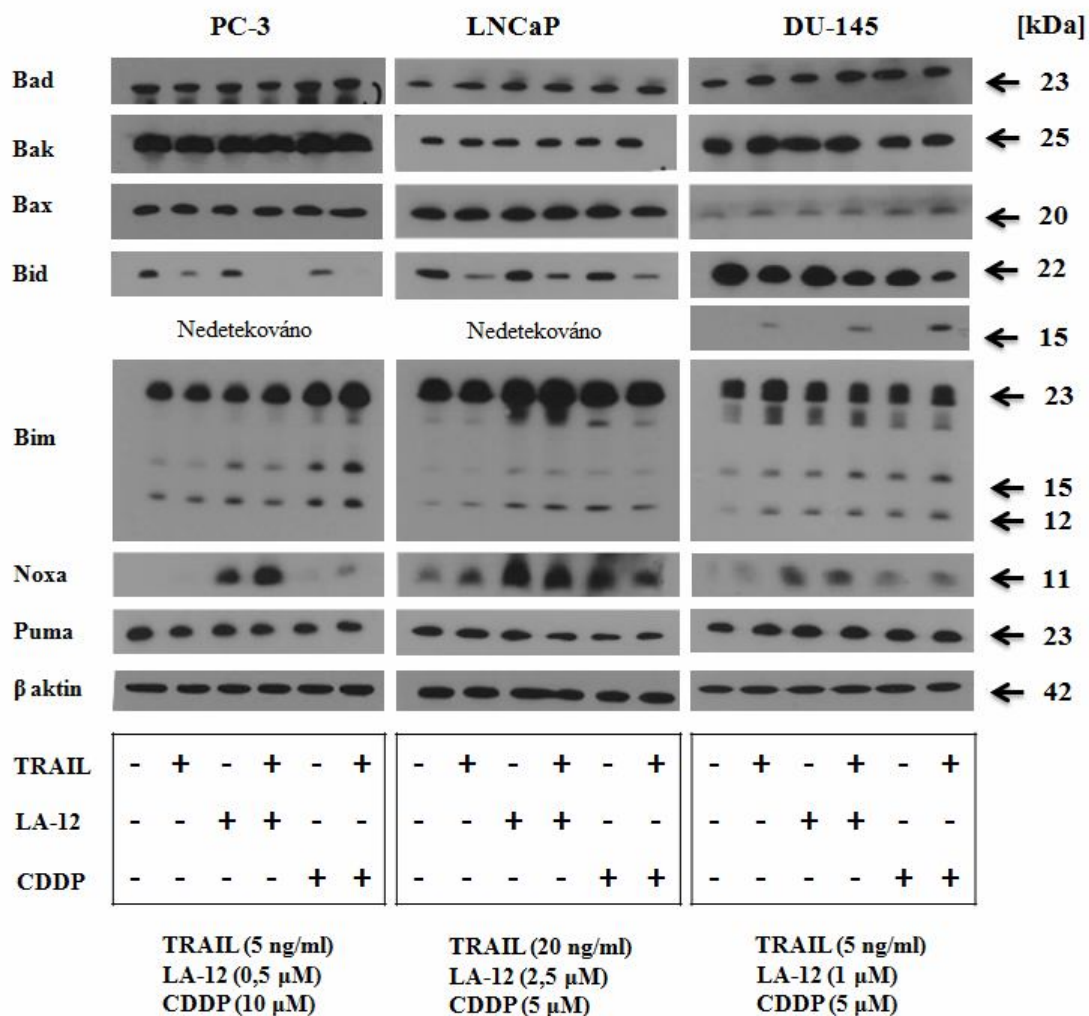


Obr. 19 Množství anti-apoptotických proteinů Bcl-X_L, Mcl-1, cIAP1, cIAP2 a XIAP u buněk PC-3, LNCaP a DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAILe (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifických protilátek). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.

5.5 Změny v množství pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 působením LA-12/CDDP a TRAILu

Působením TRAILu, LA-12, CDDP nebo kombinace těchto látek nedocházelo k významným změnám v celkovém množství proteinů Bak, Bax, Bad a Puma u tří studovaných buněčných linií. Po účinku samostatného TRAILu a v kombinaci s chemoterapeutickou látkou (LA-12, CDDP) byl pozorován úbytek množství celkového proteinu Bid u všech tří nádorových linií. U linie PC-3 je také patrné snížené množství proteinu Bid působením CDDP (srovnatelné s účinkem samostatného TRAILu) (Obr. 20). Štěpení proteinu Bid indikuje spuštění mitochondriální dráhy apoptózy a bylo doprovázeno nárůstem množství fragmentu tBid (u linie DU-145).

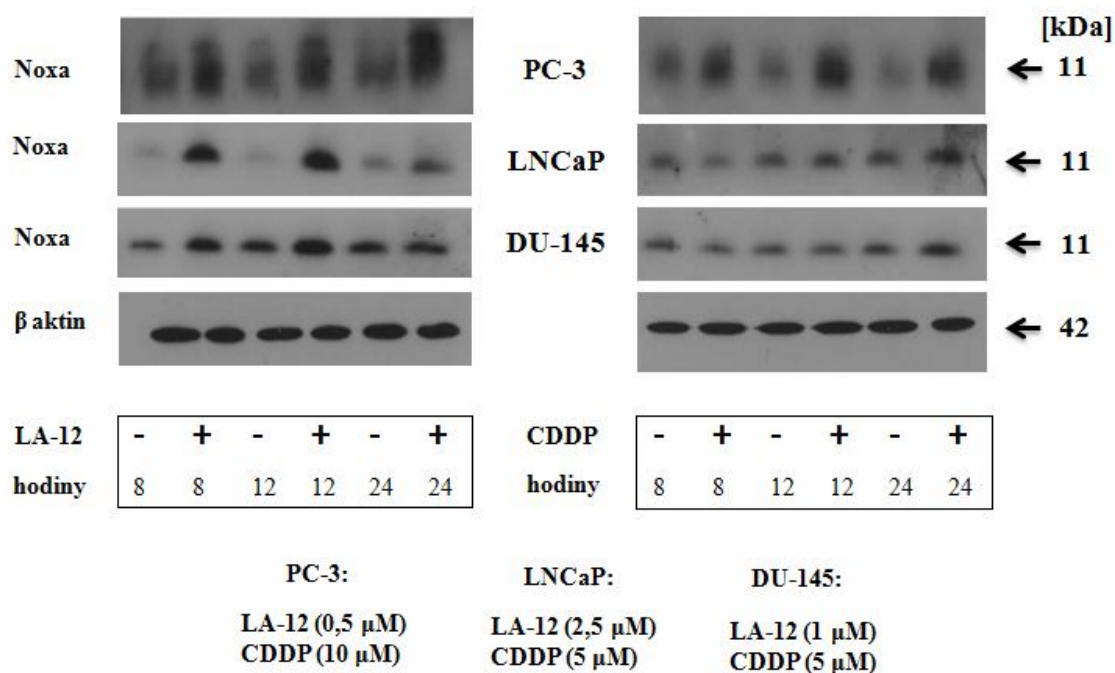
Dalšími významnými pro-apoptotickými proteiny z rodiny Bcl-2 jsou proteiny Noxa a Bim, jejichž množství významně narůstalo po působení LA-12/CDDP ve srovnání s kontrolou i samotným TRAILe, a to u všech tří nádorových linií prostaty. Tento účinek je velmi výrazný zejména po působení LA-12 a její kombinace s TRAILe (Obr. 20).



Obr. 20 Množství pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 – Bak, Bax, Bad, Puma, Bid, Noxa a Bim u buněk PC-3, LNCaP a DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAIlem (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifických protilátek). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.

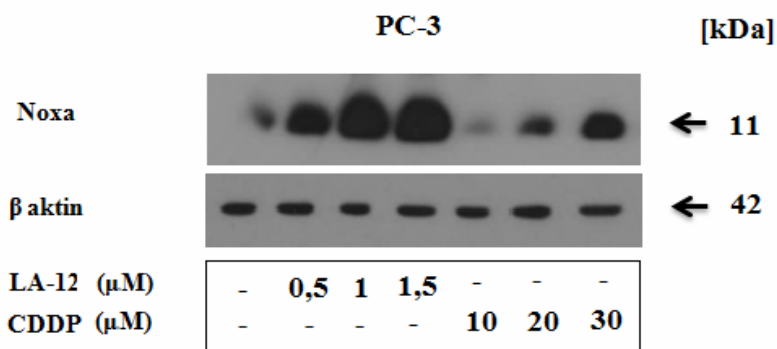
5.6 Koncentrační a časově závislé změny množství proteinu Noxa působením LA-12/ CDDP

Jelikož byl dokumentován významný nárůst množství proteinu Noxa u všech tří nádorových linií po působení (24 h) zejména látky LA-12, byly dále detailněji prozkoumány změny množství tohoto proteinu v kratších časových intervalech 1, 2, 4, 8, 12 a 24 hodin (Obr. 21). Výsledná data jsou prezentována až od 8 hodinového působení CDDP a LA-12, jelikož k výraznějšímu nárůstu množství proteinu Noxa docházelo až po této době.



Obr. 21 Časově závislé změny množství proteinu Noxa u buněčné linie PC-3, LNCaP a DU-145, inkubovaných (8, 12, 24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifické protilátky). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.

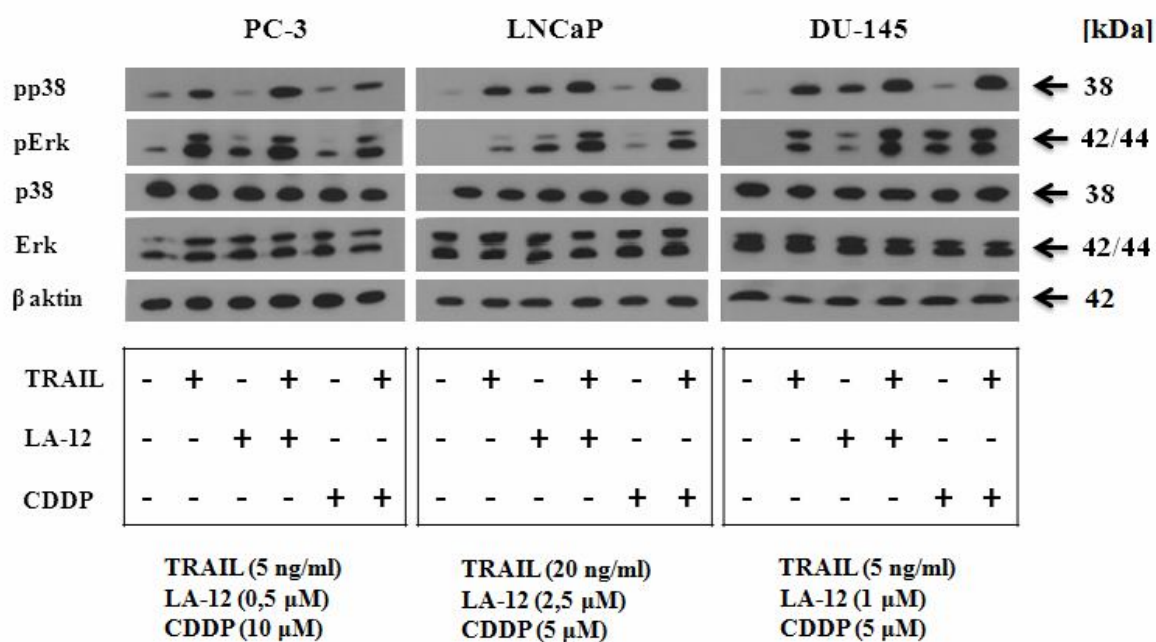
Kromě časově závislých změn proteinu Noxa byly pozorovány také ke koncentračně závislé změny jeho množství a to jak po působení LA-12, tak účinkem CDDP. Se zvyšující se koncentrací látek dochází ke zřetelnému nárůstu množství proteinu Noxa u linie PC-3 (Obr. 22).



Obr. 22 Koncentračně závislé změny množství proteinu Noxa u buněk PC-3 inkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifické protilátky). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.

5.7 Fosforylace proteinů ERK a p38 působením TRAILu a CDDP/ LA-12

Po inkubaci nádorových buněk prostaty s TRAIlem byl detekován významný nárůst fosforylace proteinů ERK a p38 ve srovnání s kontrolou. Kombinace TRAILu a LA-12/CDDP pak měla za následek další posílení aktivace ERK a p38 (LNCaP > DU-145 > PC3). U všech tří nádorových linií prostaty nedochází ke změně celkového množství proteinů ERK a p38 po studovaných podnětech (Obr.21).



Obr. 21 Celkové množství proteinů ERK a p38 a změna množství jejich fosforylovaných forem u buněk PC-3, LNCaP a DU-145, preinkubovaných (24 h) v přítomnosti LA-12 nebo CDDP a následně inkubovaných (4 h) s TRAIlem (westernový přenos, imunodetekce pomocí specifických protilátek). Příslušné koncentrace studovaných látek jsou přímo uvedeny v obrázku. Výsledky reprezentují tři nezávislá opakování experimentu.

6 Diskuze

O kombinovaném působení cytokinu TRAILu s chemoterapeutickými látkami na bázi platiny (CDDP a LA-12) u nádorových buněk prostaty bylo dosud publikováno jen omezené množství prací. V případě LA-12 je známý pouze jeden článek, který popisuje posílení apoptózy indukované TRAIlem prostřednictvím této látky u buněčné linie PC-3 (Vondálová Blanářova *et al.*, 2011). Ve své diplomové práci jsem navázala na tuto publikaci a dále zkoumala možnosti stimulace apoptózy indukované spolupůsobením cytokinu TRAIL a chemoterapeutických látek LA-12 a CDDP nejen u linie PC-3, ale nově i u buněk DU-145 a LNCaP. Jelikož zatím nejsou známy přesné mechanismy spolupůsobení těchto látek na nádorové buňky prostaty, navržení potenciálních kandidátních molekul zapojených v interakci signálních drah indukovaných těmito látkami se jeví jako důležitý předpoklad pro následné výzkumy zaměřené na studium nových možností využití výše zmíněné kombinace v budoucí klinické praxi.

Pro spuštění apoptózy indukované TRAIlem je důležitý přenos signálu přes receptory smrti na povrchu buňky. V současné době existují studie, které ukazují, že se působením CDDP či karboplatiny zvyšuje exprese DR5, což může přispět k překonání rezistence různých nádorových buněk k apoptóze indukované TRAIlem (Baritaki *et al.*, 2007; El-Gazzar *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011). Významnou úlohu mohou také hrát změny lokalizace receptorů smrti v plazmatické membráně buňky. Chemoterapeutické látky LA-12 a CDDP byly zodpovědné za relokizaci receptorů smrti DR4 a DR5 do lipidových raftů u linie PC-3, aniž by se výrazně měnilo jejich celkové množství na povrchu buňky. Kombinovaným působením cisplatiny s cytokinem TRAIL navíc došlo ke zrychlené internalizaci TRAILu u této buněčné linie (Vondálová Blanářova *et al.*, 2011). V experimentech provedených v rámci této diplomové práce se neměnilo celkové množství proteinů – receptorů pro TRAIL (DR4, DR5, DcR1, DcR2) účinkem chemoterapeutických látek, TRAILu nebo jejich kombinací u žádné ze tří studovaných linií. Uvedené výsledky naznačují, že posílení apoptózy indukované TRAIlem a LA-12/CDDP u nádorových buněk prostaty není spojeno s nutností změn celkového množství těchto receptorů.

Pro propagaci apoptotického signálu jsou esenciální kaspázy. Bylo publikováno, že kombinovaným působením TRAILu nebo lexatumumabu spolu s CDDP dochází k posílení aktivace kaspázové kaskády, a to nejen u nádorových buněk prostaty (Wu and Kakehi, 2009; Duiker *et al.*, 2011). V našem experimentálním modelu jsme pozorovali obdobný efekt na aktivaci kaspáz při působení TRAILu spolu s CDDP nebo LA-12, u všech tří nádorových

buněčných linií. S tím koreluje i posílení štěpení substrátů efektorových kaspáz (PARP, lamin B a cytokeratin 18) indukované spolupůsobením TRAILu a chemoterapeutických látek (LA-12, CDDP). Z uvedených dat je zřejmé, že kombinovaný účinek TRAILu spolu s LA-12 nebo CDDP významně posiluje apoptózu nádorových buněk prostaty. Velmi zajímavé je také srovnání působení LA-12 s CDDP s ohledem na použitou dávku. LA-12 vykazuje podobný vliv na apoptózu indukovanou TRAIlem u nádorových linií prostaty v porovnání s CDDP, ovšem ve významně nižších koncentracích, což může být její velkou výhodou pro možnou aplikaci v léčbě nádorového onemocnění.

Mezi nejvýznamnější regulátory apoptózy patří proteiny rodiny Bcl-2, které ovlivňují mitochondriální dráhu. Protein Bid je spojovacím článkem mezi receptory smrti a vnitřní dráhou apoptózy. Aktivní kaspáza -8 je schopna štěpit protein Bid a následnou translokaci tBid do mitochondrií dochází k aktivaci proapoptotických dějů na úrovni těchto organel (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Štěpený protein Bid se podílí na amplifikaci apoptotického signálu přes mitochondriální dráhu během apoptózy indukované TRAIlem (Metkar *et al.*, 2003). Úbytek celkového množství proteinu Bid po působení TRAILu a LA-12/CDDP naznačuje aktivaci mitochondriální dráhy apoptózy v našich experimentálních modelech, což bylo doprovázeno posílením aktivace kaspázy -9.

Pro-apoptotické proteiny z rodiny Bcl-2 – Noxa a Bim jsou důležité při apoptóze indukované TRAIlem, jelikož blokují anti-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (např. konstitutivní vazba proteinu Noxa s proteinem Mcl-1) (Zhang *et al.*, 2011). U nádorových buněk prostaty dochází k významnému nárůstu množství proteinů Noxa a Bim po působení platinových chemoterapeutických látek. Nárůst množství proteinu Noxa a Bim je velmi výrazný zejména po působení LA-12 u nádorových linií PC-3 a LNCaP. Zároveň bylo ukázáno, že k nárůstu množství proteinu Noxa dochází jak v závislosti na čase, tak i v závislosti na koncentraci použitých látek (LA-12, CDDP). Je možné, že proteiny Noxa a Bim by se mohly uplatňovat při regulaci apoptózy indukované TRAIlem v kombinaci s chemoterapeutickými látkami (LA-12 a CDDP), ovšem jejich funkční úloha nebyla ještě jednoznačně potvrzena.

Bylo prokázáno, že protein Mcl-1 patří mezi hlavní inhibitory apoptózy indukované jak TRAIlem, tak stresem endoplazmatického retikula a inhibitory proteasomu. Současně bylo zjištěno, že protein Noxa hraje významnou úlohu při apoptóze nádorových buněk HeLa, jelikož inhibuje anti-apoptotický protein Mcl-1 (Zhang *et al.*, 2011). Bylo ukázáno, že u nádorové linie prostaty DU-145 nastala stimulací receptorů pro TRAIL aktivace MAPK dráhy, což bylo z velké části zodpovědné za zvýšenou transkripci Mcl-1 a

následnou rezistenci buněk k apoptóze indukované TRAILem (Son *et al.*, 2010). Po působení TRAILu u nádorové linie DU-145 docházelo ke zvýšení množství proteinu Mcl-1. Zároveň se zdá, že při kombinovaném působení TRAILu spolu s chemoterapeutickými látkami (LA-12, CDDP) dochází k mírnému snížení množství proteinu Mcl-1, což by mohlo korelovat s vyšší účinností apoptózy u nádorové linie DU-145. Naopak u nádorové linie PC-3 byl zaznamenán nárůst množství proteinu Mcl-1 působením LA-12. Tyto rozdíly v odpovědi s ohledem na změny množství proteinu Mcl-1 zbývá objasnit, stejně jako jeho potenciální funkční úlohu. Mezi další důležité proteiny Bcl-2 rodiny modulující apoptózu nádorových buněk patří proteiny Bad, Bax, Bak, Puma a Bcl-X_L. U nádorových buněk prostaty ovšem nedocházelo ke změnám v množství těchto proteinů po působení TRAILu, CDDP, LA-12 nebo jejich kombinací. Z toho lze usuzovat, že tyto proteiny pravděpodobně nemají zásadní roli při posílení apoptózy indukované TRAILem v kombinaci s chemoterapeutickými látkami.

Významnými negativními regulátory apoptózy jsou proteiny rodiny cIAP, které mohou inhibovat kaspázovou aktivitu (Roy *et al.*, 1997; Deveraux *et al.*, 1998). Kombinovaná inhibice proteinů cIAP1, cIAP2 a XIAP u nádorové linie PC-3 má za následek posílení aktivity kaspáz, štěpení proteinu PARP a zejména zcitlivění linie PC-3 k apoptóze indukované TRAILem spolu s inhibicí proliferace těchto buněk (Gill *et al.*, 2009). Apoptóza indukovaná TRAILem u nádorového onemocnění jater je spojená s degradací proteinu cIAP1 účinkem kaspázy-8 (Guicciardi *et al.*, 2011). Proteiny cIAP1 a cIAP2 jsou často zvýšeně exprimované u nádorových buněk. U ovariálního karcinomu rezistentního k platinové léčbě byla popsána zvýšená exprese proteinu cIAP2 po působení CDDP (Cohen *et al.*, 2013). V našem experimentálním modelu ovšem nedocházelo ke změnám množství proteinů cIAP1 ani cIAP2 po působení jak samostatných látek (TRAILu, CDDP a LA-12), tak po jejich kombinovaném působení, což by mohlo naznačovat, že tyto anti-apoptotické proteiny pravděpodobně nemají klíčový význam při posílení apoptózy indukované TRAILem vlivem platinových chemoterapeutických látek u nádorových buněk prostaty.

Do rodiny cIAP proteinů patří i protein XIAP, který je významným inhibitorem apoptózy. Použití specifického inhibitoru pro XIAP v kombinaci s CDDP nebo TRAILem u linie DU-145 vyvolalo posílení apoptózy (Amantana *et al.*, 2004). U nádorových buněk děložního hrdla dochází při působení CDDP v kombinaci s TRAILem k výraznému posílení aktivace kaspáz a ke snížení množství proteinu XIAP (Tan *et al.*, 2012). Bylo popsáno, že zcitlivění nádorových buněk k působení TRAILu je doprovázeno štěpením proteinu XIAP, závislým na kaspázách (Mühlethaler-Mottet *et al.*, 2004). Později byl u melanomových buněk částečně objasněn mechanismus, pomocí kterého může docházet ke štěpení proteinu XIAP

kaspázami. Melanomové buňky jsou rezistentní k apoptóze indukované TRAILem z důvodu nedokončené maturace kaspázy -3. Samostatným působením TRAILu nedocházelo ke štěpení proteinu XIAP, ale spolupůsobením s UVB či CDDP nastala zrychlená permeabilizace mitochondriální membrány s následným uvolněním antagonistů proteinu XIAP (Smac/DIABLO). Díky tomu byla uvolněna a aktivována kaspáza -3, která je zodpovědná za endogenní štěpení proteinu XIAP, což je předpoklad pro následnou proteazomovou degradaci tohoto anti-apoptického proteinu a zcitlivění melanomových buněk k apoptóze indukované TRAILem (Hörnle *et al.*, 2011). Po kombinovaném působení TRAILu spolu s CDDP a LA-12 byl u nádorových linií prostaty pozorován úbytek množství celkového proteinu XIAP a byly identifikovány fragmenty tohoto proteinu. Tyto výsledky naznačují možné štěpení proteinu XIAP s účastí kaspáz u nádorových buněk prostaty následkem kombinovaného působení TRAILu spolu s CDDP a LA-12.

Dalšími významnými proteiny regulujícími apoptózu nádorových buněk mohou být proteiny p38 a ERK. Inhibicí ERK a p38 dráhy dochází k zcitlivění buněk k apoptóze indukované TRAILem prostřednictvím kaspázy -3 a zapojením mitochondriální dráhy přes protein Bid jak *in vitro*, tak u myšího modelu (Chiacchiera *et al.*, 2012). Při supresi dráhy ERK dochází k posílení rezistence nádorových buněk k CDDP, což naznačuje korelaci mezi aktivací proteinu ERK a citlivostí buněk k CDDP (Wang *et al.*, 2000; Schweyer *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Byla nalezena souvislost mezi fosforylací proteinu ERK a expresí proteinu Mcl-1 u nádorových buněk kolonu (Vaculová *et al.*, 2009). Podobně tomu je i u buněk ovariálního karcinomu. Zdá se, že indukce signalizace ERK1/ERK2/ELK-1 je velmi významná pro regulaci exprese Mcl-1 proteinu a apoptózy indukované TRAILem (Goncharenko-Khaider *et al.*, 2012). U nádorových buněk prostaty narůstalo množství fosforylovaných proteinů ERK a p38 účinkem TRAILu, dále posílené kombinovaným působením TRAILu spolu CDDP nebo LA-12. Zároveň nedocházelo ke změně celkového množství proteinů ERK a p38 působením jak samostatných látek (TRAIL, CDDP, LA-12), tak jejich kombinací. Jelikož dosud nebyly dokončeny experimenty zaměřené na funkční úlohu fosforylovaných proteinů ERK a p38, nelze s jistotou tvrdit, jaký účinek mají tyto proteiny na apoptózu nádorových buněk prostaty po kombinovaném působení TRAILu s LA-12 nebo CDDP.

Výsledky této diplomové práce, dokumentující účinnou spolupráci chemoterapeutických látek na bázi platiny a cytokinu TRAIL v posílení apoptózy indukované TRAILem, naznačují nové potenciální možnosti eliminace nádorových buněk prostaty. Zejména slibná a zajímavá je kombinace TRAILu spolu s chemoterapeutickou látkou LA-12, jelikož je tato látka

schopná vyvolat u nádorových linií prostaty stejně účinnou apoptotickou odpověď jako kombinace TRAILu s CDDP, ovšem při použití mnohem nižší koncentrace ve srovnání s CDDP.

7 Souhrn

1. Použitím TRAILu v kombinaci s platinovými chemoterapeutickými látkami (CDDP, LA-12) dochází k výraznému posílení apoptózy u nádorových buněk prostaty ve srovnání s jejich samostatným působením. Velmi přínosné pro možné budoucí využití v klinické praxi je zjištění, že LA-12, která byla použita ve významně nižších koncentracích v kombinaci s TRAILe, vykazovala srovnatelně účinnou apoptotickou odpověď jako tomu bylo při aplikaci TRAILu spolu s vyšší dávkou CDDP.
2. Stimulace apoptózy nádorových buněk prostaty po kombinovaném působení LA-12/CDDP a TRAILu
 - a) je spojena s výraznou aktivací kaspáz a štěpením jejich substrátů (PARP, lamin B a cytokeratin 18),
 - b) není doprovázena změnou celkového množství receptorů pro TRAIL,
 - c) zahrnuje aktivaci mitochondriální dráhy a změny na úrovni mitochondrií, jako jsou zvýšené štěpení proteinu Bid, nárůst množství proteinů Noxa a Bim a aktivace kaspázy -9,
 - d) je doprovázena zvýšenou aktivací kináz p38 a ERK.

Pro podrobnější porozumění molekulárním mechanismům zodpovědným za regulaci apoptózy nádorových buněk prostaty po působení TRAILu a chemoterapeutických látek bude ještě potřeba provést řadu experimentů. V rámci této diplomové práce bylo navrženo několik výše uvedených molekul, jejichž funkční význam v zavedeném modelu by bylo zajímavé dále studovat.

Seznam zkratek

AIF	Apoptosis inducing factor	Faktor indukující apoptózu
Akt	Serine/threonine protein kinase Akt	Serin/threoninová kináza Akt
AP-1	Activator protein 1	Aktivační protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1	Faktor aktivující apoptotickou proteázu
Bad	Bcl-2-associated death promoter	Protein rodiny Bcl-2
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer	Protein rodiny Bcl-2
Bax	Bcl-2-associated X protein	Protein rodiny Bcl-2
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 protein	Protein rodiny Bcl-2
Bcl-w	Bcl-2 like protein	Protein rodiny Bcl-2
Bcl-X_L	B-cell leukemia/lymphoma long	Protein rodiny Bcl-2
BH	Bcl-2 homology domain	Bcl-2 homologní doména
Bid	BH3 interacting domain death agonist	Protein rodiny Bcl-2
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death	Protein rodiny Bcl-2
Bmf	Bcl-2 modifying factor	Protein rodiny Bcl-2
CDDP	cis-diamminedichloroplatinum	cis-diamminedichloroplatinum
c-FLIP	Celular (FLICE) –like inhibitory protein	Inhibiční protein podobný FLICE – tj. Kaspáze-8
cIAP	Celular inhibitor of apoptosis protein	Buněčné proteiny inhibující apoptózu
DBD	DNA-binding doamin	DNA vazebná doména
DcR1 (TRAIL-R3)	Decoy receptor 1	Inhibiční receptor pro TRAIL
DcR2 (TRAIL-R4)	Decoy receptor 2	Inhibiční receptor pro TRAIL
DD	Death domain	Doména smrti
DED	Death effector domain	Efektorová doména smrti
Diablo	Direct IAP binding protein with low pI	= Smacs, protein uvolňovaný z mitochondrií inhibující funkci IAP
DISC	Death-inducing signaling complex	Signální komplex indukující smrt
DR4 (TRAIL-R1, APO-2)	Death receptor 4	Receptor smrti 4
DR5 (TRAIL-R2, TRICK, Killer)	Death receptor 5	Receptor smrti 5

ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Proteinkináza regulování extracelulárním signálem
FADD	Fas-associated death domain	Adaptérový protein účastnící se tvorby komplexu DISC
HIF1	Hypoxia-inducible factor	Faktor indukovaný hypoxií
HMG	High mobility group	Skupina proteinů s vysokou mobilitou
HPV	Human papilloma virus	Lidský papillomavirus
HRPC	Hormone refractory prostate cancer	Hormonálně refrakterní karcinom prostaty
Hsp	Heat-shock protein	Protein teplotního šoku
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Protein kináza aktivována mitogeny
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 protein	Protein rodiny Bcl-2
MMR	Missmatch repair	Oprava chybného párování nukleotidů
NER	Nucleotide excision repair	Nukleotidová excizní reparace
NF-κB	Nuclear factor κB	Jaderný faktor κB
NK	Natural killers	Přirozeně zabíjející buňky
OPG	Osteoprotegerin	Osteoprotegerin
PARP	Poly(ADP)ribose polymerase	Poly(ADP)ribosyl polymeráza
PI3K	Phosphoinositide-dependent kinase-1	Kináza závislá na fosfoinositidu
Rb4	Retinoblastoma protein 4	Vazebný protein pro retinol
siRNA	Short interfering RNA	Krátká interferující RNA
tBid	Truncated Bid	Zkrácený a aktivovaný protein Bid
TNF	Tumor necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand	Ligand indukující apoptózu příbuzný s TNF
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein	Inhibitor apoptózy, nacházející se na chromozomu X
YY1	Yin Yang 1	Yin Yang transkripční faktor

8 Seznam literatury

- Amantana, A., London, C. A., Iversen, P. L. and Devi, G. R.** (2004). "X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells." *Mol Cancer Ther* **3**(6): 699-707.
- Antonsson, B.** (2001). "Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion." *Cell Tissue Res* **306**(3): 347-361.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.** (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-1308.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y.** (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." *Science* **281**(5383): 1674-1677.
- Baritaki, S., Huerta-Yepez, S., Sakai, T., Spandidos, D. A. and Bonavida, B.** (2007). "Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1." *Mol Cancer Ther* **6**(4): 1387-1399.
- Bouchal, P., Jarkovsky, J., Hrazdilova, K., Dvorakova, M., Struharova, I., Hernychova, L., Damborsky, J., Sova, P. and Vojtesek, B.** (2011). "The new platinum-based anticancer agent LA-12 induces retinol binding protein 4 in vivo." *Proteome Sci* **9**(1): 68.
- Boulikas, T. and Vougiouka, M.** (2003). "Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review)." *Oncol Rep* **10**(6): 1663-1682.
- Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak, M. and Kaina, B.** (2004). "Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance." *Int J Cancer* **112**(6): 974-985.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X.** (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 269-290.
- Caulin, C., Salvesen, G. S. and Oshima, R. G.** (1997). "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis." *J Cell Biol* **138**(6): 1379-1394.
- Cermanova, J., Chladek, J., Soval, P., Kroutil, A., Semerad, M., Berankova, Z., Siroky, P. and Surova, I.** (2004). "Single-dose pharmacokinetics of a novel oral platinum cytostatic drug ([OC-6-43]-bis[acetato][1-adamantylamine]amminedichloroplatinum [IV]) in pigs." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **26**(9): 679-685.
- Ciszewski, A., Shackleton, D. and Beer, T. M.** (2008). "Long-term remission of metastatic small cell carcinoma of the prostate." *Urology* **71**(3): 546 e543-544.
- Cohen, S., Bruchim, I., Graiver, D., Evron, Z., Oron-Karni, V., Pasmanik-Chor, M., Eitan, R., Bernheim, J., Levavi, H., Fishman, A. and Flescher, E.** (2013). "Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2." *J Mol Med (Berl)* **91**(3): 357-368.
- Culig, Z., Hoffmann, J., Erdel, M., Eder, I. E., Hobisch, A., Hittmair, A., Bartsch, G., Utermann, G., Schneider, M. R., Parczyk, K. and Klocker, H.** (1999). "Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system." *Br J Cancer* **81**(2): 242-251.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." *EMBO J* **17**(8): 2215-2223.

- Diallo, J. S., Aldejmah, A., Mouhim, A. F., Peant, B., Fahmy, M. A., Koumakpayi, I. H., Sircar, K., Begin, L. R., Mes-Masson, A. M. and Saad, F.** (2007). "NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model." *Clin Cancer Res* **13**(23): 7044-7052.
- Ding, L., Yuan, C., Wei, F., Wang, G., Zhang, J., Bellail, A. C., Zhang, Z., Olson, J. J. and Hao, C.** (2011). "Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP." *Cancer Invest* **29**(8): 511-520.
- Droz, J. P., Muracciole, X., Mottet, N., Ould Kaci, M., Vannetzel, J. M., Albin, N., Culine, S., Rodier, J. M., Misset, J. L., Mackenzie, S., Cvitkovic, E. and Benoit, G.** (2003). "Phase II study of oxaliplatin versus oxaliplatin combined with infusional 5-fluorouracil in hormone refractory metastatic prostate cancer patients." *Ann Oncol* **14**(8): 1291-1298.
- Duiker, E. W., Meijer, A., van der Bilt, A. R., Meersma, G. J., Kooi, N., van der Zee, A. G., de Vries, E. G. and de Jong, S.** (2011). "Drug-induced caspase 8 upregulation sensitises cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells to rhTRAIL-induced apoptosis." *Br J Cancer* **104**(8): 1278-1287.
- Ehrhardt, H., Hofig, I., Wachter, F., Obexer, P., Fulda, S., Terziyska, N. and Jeremias, I.** (2012). "NOXA as critical mediator for drug combinations in polychemotherapy." *Cell Death Dis* **3**: e327.
- El-Gazzar, A., Perco, P., Eckelhart, E., Anees, M., Sexl, V., Mayer, B., Liu, Y., Mikulits, W., Horvat, R., Pangerl, T., Zheng, D. and Krainer, M.** (2010). "Natural immunity enhances the activity of a DR5 agonistic antibody and carboplatin in the treatment of ovarian cancer." *Mol Cancer Ther* **9**(4): 1007-1018.
- El Fajoui, Z., Toscano, F., Jacquemin, G., Abello, J., Scoazec, J. Y., Micheau, O. and Saurin, J. C.** (2011). "Oxaliplatin sensitizes human colon cancer cells to TRAIL through JNK-dependent phosphorylation of Bcl-xL." *Gastroenterology* **141**(2): 663-673.
- Fajac, A., Da Silva, J., Ahomadegbe, J. C., Rateau, J. G., Bernaudin, J. F., Riou, G. and Benard, J.** (1996). "Cisplatin-induced apoptosis and p53 gene status in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line." *Int J Cancer* **68**(1): 67-74.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. and Walczak, H.** (2007). "TRAIL signalling: decisions between life and death." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(7-8): 1462-1475.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R. D. and Howell, S. B.** (1996). "The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance." *Cancer Res* **56**(21): 4881-4886.
- Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P. S., Aebi, S., Lin, T. P., Nehme, A., Christen, R. D., Haas, M., MacLeod, C. L. and Howell, S. B.** (1997). "In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair." *Cancer Res* **57**(10): 1841-1845.
- Fokkema, E., Groen, H. J., Helder, M. N., de Vries, E. G. and Meijer, C.** (2002). "JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum-DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin." *Biochem Pharmacol* **63**(11): 1989-1996.
- Foltinová, V., Švihálková Šindlerová, L., Horváth, V., Sova, P., Hofmanová, J., Janisch, R. and Kozubík, A.** (2008). "Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with satraplatin and LA-12, new Pt(IV)-based drugs . A MINIREVIEW." *SCRIPTA MEDICA (BRNO)* – **81** (2): 105–116, June 2008 **81**(2): 115-116.
- Galligan, L., Longley, D. B., McEwan, M., Wilson, T. R., McLaughlin, K. and Johnston, P. G.** (2005). "Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP." *Mol Cancer Ther* **4**(12): 2026-2036.
- Garmey, E. G., Sartor, O., Halabi, S. and Vogelzang, N. J.** (2008). "Second-line chemotherapy for advanced hormone-refractory prostate cancer." *Clin Adv Hematol Oncol* **6**(2): 118-122, 127-132.

- Gill, C., Dowling, C., O'Neill, A. J. and Watson, R. W.** (2009). "Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation." *Mol Cancer* **8**: 39.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Chute, C. C. and Willett, W. C.** (1993). "A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **85**(19): 1571-1579.
- Gogada, R., Yadav, N., Liu, J., Tang, S., Zhang, D., Schneider, A., Seshadri, A., Sun, L., Aldaz, C. M., Tang, D. G. and Chandra, D.** (2012). "Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer." *J Biol Chem* **288**(1): 368-381.
- Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Jr., Levrero, M. and Wang, J. Y.** (1999). "The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage." *Nature* **399**(6738): 806-809.
- Goncharenko-Khaider, N., Matte, I., Lane, D., Rancourt, C. and Piche, A.** (2012). "Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis." *Mol Cancer* **11**: 84.
- Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J. and Shore, G. C.** (1998). "Regulated targeting of BAX to mitochondria." *J Cell Biol* **143**(1): 207-215.
- Guicciardi, M. E., Mott, J. L., Bronk, S. F., Kurita, S., Fingas, C. D. and Gores, G. J.** (2011). "Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP-1) degradation by caspase 8 during TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis." *Exp Cell Res* **317**(1): 107-116.
- Hamdi, M., Kool, J., Cornelissen-Steijger, P., Carlotti, F., Popeijus, H. E., van der Burgt, C., Janssen, J. M., Yasui, A., Hoeben, R. C., Terleth, C., Mullenders, L. H. and van Dam, H.** (2005). "DNA damage in transcribed genes induces apoptosis via the JNK pathway and the JNK-phosphatase MKP-1." *Oncogene* **24**(48): 7135-7144.
- Han, J., Goldstein, L. A., Hou, W. and Rabinowich, H.** (2007). "Functional linkage between NOXA and Bim in mitochondrial apoptotic events." *J Biol Chem* **282**(22): 16223-16231.
- Han, S. J., Ahn, T. K., Choi, H. S., Shin, J. N., Piya, S. and Kim, T. H.** (2009). "TRAIL-induced cell death and caspase-8 activation are inhibited by cisplatin but not carboplatin." *J Gynecol Oncol* **20**(2): 113-116.
- Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Ikegami, H., Kimura, A., Matsuoka, T., Jikihara, H., Mercola, D. and Murata, Y.** (1999). "Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line." *J Biol Chem* **274**(44): 31648-31654.
- Hernandez Losa, J., Parada Cobo, C., Guinea Viniegra, J., Sanchez-Arevalo Lobo, V. J., Ramon y Cajal, S. and Sanchez-Prieto, R.** (2003). "Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy." *Oncogene* **22**(26): 3998-4006.
- Hershko, T. and Ginsberg, D.** (2004). "Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis." *J Biol Chem* **279**(10): 8627-8634.
- Hijikata, M., Kato, N., Sato, T., Kagami, Y. and Shimotohno, K.** (1990). "Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line." *J Virol* **64**(10): 4632-4639.
- Hofbauer, L. C., Ten, R. M. and Khosla, S.** (1999). "The anti-androgen hydroxyflutamide and androgens inhibit interleukin-6 production by an androgen-responsive human osteoblastic cell line." *J Bone Miner Res* **14**(8): 1330-1337.
- Hörnle, M., Peters, N., Thayaparasingham, B., Vorsmann, H., Kashkar, H. and Kulms, D.** (2011). "Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis." *Oncogene* **30**(5): 575-587.

- Horvath, V., Blanarova, O., Svihalkova-Sindlerova, L., Soucek, K., Hofmanova, J., Sova, P., Kroutil, A., Fedorocko, P. and Kozubik, A.** (2006). "Platinum(IV) complex with adamantylamine overcomes intrinsic resistance to cisplatin in ovarian cancer cells." *Gynecol Oncol* **102**(1): 32-40.
- Horvath, V., Soucek, K., Svihalkova-Sindlerova, L., Vondracek, J., Blanarova, O., Hofmanova, J., Sova, P. and Kozubik, A.** (2007). "Different cell cycle modulation following treatment of human ovarian carcinoma cells with a new platinum(IV) complex vs cisplatin." *Invest New Drugs* **25**(5): 435-443.
- Huang, D. C. and Strasser, A.** (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* **103**(6): 839-842.
- Huang, J. C., Zamble, D. B., Reardon, J. T., Lippard, S. J. and Sancar, A.** (1994). "HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10394-10398.
- Huang, T., Gong, W. H., Li, X. C., Zou, C. P., Jiang, G. J., Li, X. H. and Qian, H.** (2012). "Oxaliplatin sensitizes OS cells to TRAIL-induced apoptosis via down-regulation of Mcl1." *Asian Pac J Cancer Prev* **13**(7): 3477-3481.
- Huang, W. C. and Hung, M. C.** (2009). "Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance." *J Formos Med Assoc* **108**(3): 180-194.
- Huggins, C. and Hodges, C. V.** (1941). "Studies on prostatic cancer: The effects of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate." *Cancer Res*(1): 293-297.
- Chaney, S. G., Campbell, S. L., Temple, B., Bassett, E., Wu, Y. and Faldu, M.** (2004). "Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function." *J Inorg Biochem* **98**(10): 1551-1559.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. and Huang, D. C.** (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chiacchiera, F., Grossi, V., Cappellari, M., Peserico, A., Simonatto, M., Germani, A., Russo, S., Moyer, M. P., Resta, N., Murzilli, S. and Simone, C.** (2012). "Blocking p38/ERK crosstalk affects colorectal cancer growth by inducing apoptosis in vitro and in preclinical mouse models." *Cancer Lett* **324**(1): 98-108.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. and Browning, J. L.** (1997). "TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis." *J Biol Chem* **272**(51): 32401-32410.
- Ignéy, F. H. and Krammer, P. H.** (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-288.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J. and Thun, M. J.** (2005). "Cancer statistics, 2005." *CA Cancer J Clin* **55**(1): 10-30.
- Jones, N. A., Turner, J., McIlwrath, A. J., Brown, R. and Dive, C.** (1998). "Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53." *Mol Pharmacol* **53**(5): 819-826.
- Kaina, B., Haas, S. and Kappes, H.** (1997). "A general role for c-Fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs." *Cancer Res* **57**(13): 2721-2731.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G.** (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* **53**(17): 3976-3985.
- Kelland, L.** (2007). "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." *Nat Rev Cancer* **7**(8): 573-584.

- Kentepozidis, N., Soultati, A., Giassas, S., Vardakis, N., Kalykaki, A., Kotsakis, A., Papadimitraki, E., Pantazopoulos, N., Bozionellou, V. and Georgoulas, V.** (2012). "Paclitaxel in combination with carboplatin as salvage treatment in patients with castration-resistant prostate cancer: a Hellenic oncology research group multicenter phase II study." *Cancer Chemother Pharmacol* **70**(1): 161-168.
- Kikuno, N., Urakami, S., Nakamura, S., Hiraoka, T., Hyuga, T., Arichi, N., Wake, K., Sumura, M., Yoneda, T., Kishi, H., Shigeno, K., Shiina, H. and Igawa, M.** (2007). "Phase-II study of docetaxel, estramustine phosphate, and carboplatin in patients with hormone-refractory prostate cancer." *Eur Urol* **51**(5): 1252-1258.
- Kim, J. Y., Ahn, H. J., Ryu, J. H., Suk, K. and Park, J. H.** (2004). "BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha." *J Exp Med* **199**(1): 113-124.
- Kim, S. T. and Koh, J. W.** (2011). "Mechanisms of apoptosis on human lens epithelium after ultraviolet light exposure." *Korean J Ophthalmol* **25**(3): 196-201.
- Kim, Y. K., Kim, H. J., Kwon, C. H., Kim, J. H., Woo, J. S., Jung, J. S. and Kim, J. M.** (2005). "Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells." *J Appl Toxicol* **25**(5): 374-382.
- Kimberley, F. C. and Screaton, G. R.** (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." *Cell Res* **14**(5): 359-372.
- Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A. and Roberts, J. J.** (1986). "Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA." *Cancer Res* **46**(4 Pt 2): 1972-1979.
- Köhler, B., Anguissola, S., Concannon, C. G., Rehm, M., Kogel, D. and Prehn, J. H.** (2008). "Bid participates in genotoxic drug-induced apoptosis of HeLa cells and is essential for death receptor ligands' apoptotic and synergistic effects." *PLoS One* **3**(7): e2844.
- Komatsu, M., Sumizawa, T., Mutoh, M., Chen, Z. S., Terada, K., Furukawa, T., Yang, X. L., Gao, H., Miura, N., Sugiyama, T. and Akiyama, S.** (2000). "Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance." *Cancer Res* **60**(5): 1312-1316.
- Kondo, Y., Kuo, S. M., Watkins, S. C. and Lazo, J. S.** (1995). "Metallothionein localization and cisplatin resistance in human hormone-independent prostatic tumor cell lines." *Cancer Res* **55**(3): 474-477.
- Kozubik, A., Horvath, V., Svihalkova-Sindlerova, L., Soucek, K., Hofmanova, J., Sova, P., Kroutil, A., Zak, F., Mistr, A. and Turanek, J.** (2005). "High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro." *Biochem Pharmacol* **69**(3): 373-383.
- Kumar, S.** (2007). "Caspase function in programmed cell death." *Cell Death Differ* **14**(1): 32-43.
- Kvardova, V., Hrstka, R., Walerych, D., Muller, P., Matoulkova, E., Hruskova, V., Stelcova, D., Sova, P. and Vojtesek, B.** (2010). "The new platinum(IV) derivative LA-12 shows stronger inhibitory effect on Hsp90 function compared to cisplatin." *Mol Cancer* **9**: 147.
- Lei, K. and Davis, R. J.** (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2432-2437.
- Leong, S., Cohen, R. B., Gustafson, D. L., Langer, C. J., Camidge, D. R., Padavic, K., Gore, L., Smith, M., Chow, L. Q., von Mehren, M., O'Bryant, C., Hariharan, S., Diab, S., Fox, N. L., Miceli, R. and Eckhardt, S. G.** (2009). "Mapatumumab, an antibody targeting TRAIL-R1, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced solid malignancies: results of a phase I and pharmacokinetic study." *J Clin Oncol* **27**(26): 4413-4421.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J.** (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.

- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J.** (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.
- Loh, S. Y., Mistry, P., Kelland, L. R., Abel, G. and Harrap, K. R.** (1992). "Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes." *Br J Cancer* **66**(6): 1109-1115.
- Luciano, F., Jacquel, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G. and Auburger, P.** (2003). "Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function." *Oncogene* **22**(43): 6785-6793.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.** (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-490.
- MacFarlane, M., Merrison, W., Dinsdale, D. and Cohen, G. M.** (2000). "Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis." *J Cell Biol* **148**(6): 1239-1254.
- Mandic, A., Hansson, J., Linder, S. and Shoshan, M. C.** (2003). "Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling." *J Biol Chem* **278**(11): 9100-9106.
- Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B. and Claret, F. X.** (2003). "Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells." *J Biol Chem* **278**(21): 19245-19256.
- Marani, M., Hancock, D., Lopes, R., Tenev, T., Downward, J. and Lemoine, N. R.** (2004). "Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells." *Oncogene* **23**(14): 2431-2441.
- Masiello, D., Cheng, S., Buble, G. J., Lu, M. L. and Balk, S. P.** (2002). "Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor." *J Biol Chem* **277**(29): 26321-26326.
- Metkar, S. S., Wang, B., Ebbs, M. L., Kim, J. H., Lee, Y. J., Raja, S. M. and Froelich, C. J.** (2003). "Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis." *J Cell Biol* **160**(6): 875-885.
- Misset, J. L., Bleiberg, H., Sutherland, W., Bekradda, M. and Cvitkovic, E.** (2000). "Oxaliplatin clinical activity: a review." *Crit Rev Oncol Hematol* **35**(2): 75-93.
- Mühlethaler-Mottet, A., Bourlond, K. B., Auderset, K., Joseph, J. M. and Gross, N.** (2004). "Drug-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in caspase-8-complemented neuroblastoma cells proceeds via activation of intrinsic and extrinsic pathways and caspase-dependent cleavage of XIAP, Bcl-xL and RIP." *Oncogene* **23**(32): 5415-5425.
- Munshi, A., McDonnell, T. J. and Meyn, R. E.** (2002). "Chemotherapeutic agents enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells." *Cancer Chemother Pharmacol* **50**(1): 46-52.
- Nehme, A., Baskaran, R., Aebi, S., Fink, D., Nebel, S., Cenni, B., Wang, J. Y., Howell, S. B. and Christen, R. D.** (1997). "Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin." *Cancer Res* **57**(15): 3253-3257.
- Nehme, A., Baskaran, R., Nebel, S., Fink, D., Howell, S. B., Wang, J. Y. and Christen, R. D.** (1999). "Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells." *Br J Cancer* **79**(7-8): 1104-1110.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S. and Huang, D. C.** (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." *EMBO J* **17**(2): 384-395.

- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N.** (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-1058.
- Oh, W. K., George, D. J. and Tay, M. H.** (2005). "Response to docetaxel/carboplatin in patients with hormone-refractory prostate cancer not responding to taxane-based chemotherapy." *Clin Prostate Cancer* **4**(1): 61-64.
- Oh, W. K., Tay, M. H. and Huang, J.** (2007). "Is there a role for platinum chemotherapy in the treatment of patients with hormone-refractory prostate cancer?" *Cancer* **109**(3): 477-486.
- Oniscu, A., Sphyris, N., Morris, R. G., Bader, S. and Harrison, D. J.** (2004). "p73alpha is a candidate effector in the p53 independent apoptosis pathway of cisplatin damaged primary murine colonocytes." *J Clin Pathol* **57**(5): 492-498.
- Perez, R. P.** (1998). "Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance." *Eur J Cancer* **34**(10): 1535-1542.
- Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M., Cui, W. and Pelling, J. C.** (1999). "Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin." *Clin Cancer Res* **5**(5): 1007-1014.
- Peter, M. E. and Krammer, P. H.** (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis." *Curr Opin Immunol* **10**(5): 545-551.
- Pietkiewicz, S., Sohn, D., Piekorz, R. P., Grether-Beck, S., Budach, W., Sabapathy, K. and Janicke, R. U.** (2013). "Oppositional Regulation of Noxa by JNK1 and JNK2 during Apoptosis Induced by Proteasomal Inhibitors." *PLoS One* **8**(4): e61438.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. and Ashkenazi, A.** (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." *J Biol Chem* **271**(22): 12687-12690.
- Porter, A. G. and Janicke, R. U.** (1999). "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis." *Cell Death Differ* **6**(2): 99-104.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M. and Strasser, A.** (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* **3**(3): 287-296.
- Putcha, G. V., Le, S., Frank, S., Besirli, C. G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R. J., LaMarche, A., Maroney, A. C. and Johnson, E. M., Jr.** (2003). "JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis." *Neuron* **38**(6): 899-914.
- Rao, L., Perez, D. and White, E.** (1996). "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 1): 1441-1455.
- Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A. and Cvitkovic, E.** (1998). "Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies." *Ann Oncol* **9**(10): 1053-1071.
- Reardon, J. T., Vaisman, A., Chaney, S. G. and Sancar, A.** (1999). "Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts." *Cancer Res* **59**(16): 3968-3971.
- Roldan, A. M., Nunez, N. F., Grande, E., Garcia, A. A. and Anton-Aparicio, L. M.** (2012). "A primary signet ring cell carcinoma of the prostate with bone metastasis with impressive response to FOLFOX and cetuximab." *Clin Genitourin Cancer* **10**(3): 199-201.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. and Krigas, T.** (1965). "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode." *Nature* **205**: 698-699.

- Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. and Mansour, V. H.** (1969). "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents." *Nature* **222**(5191): 385-386.
- Roubalova, E., Kvardova, V., Hrstka, R., Borilova, S., Michalova, E., Dubska, L., Muller, P., Sova, P. and Vojtesek, B.** (2010). "The effect of cellular environment and p53 status on the mode of action of the platinum derivative LA-12." *Invest New Drugs* **28**(4): 445-453.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. and Reed, J. C.** (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." *EMBO J* **16**(23): 6914-6925.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J. and Martinez-Climent, J. A.** (2005). "Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes." *Blood* **106**(9): 3214-3222.
- Sadowitz, P. D., Hubbard, B. A., Dabrowiak, J. C., Goodisman, J., Tacka, K. A., Aktas, M. K., Cunningham, M. J., Dubowy, R. L. and Souid, A. K.** (2002). "Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs." *Drug Metab Dispos* **30**(2): 183-190.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P.** (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." *Oncogene* **23**(16): 2861-2874.
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M.** (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10964-10967.
- Samimi, G., Varki, N. M., Wilczynski, S., Safaei, R., Alberts, D. S. and Howell, S. B.** (2003). "Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients." *Clin Cancer Res* **9**(16 Pt 1): 5853-5859.
- Shimazu, T., Degenhardt, K., Nur, E. K. A., Zhang, J., Yoshida, T., Zhang, Y., Mathew, R., White, E. and Inouye, M.** (2007). "NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition." *Genes Dev* **21**(8): 929-941.
- Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H. J. and Fayyazi, A.** (2004). "Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation." *Br J Cancer* **91**(3): 589-598.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A.** (2010). "The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer." *Adv Cancer Res* **108**: 73-112.
- Son, J. K., Varadarajan, S. and Bratton, S. B.** (2010). "TRAIL-activated stress kinases suppress apoptosis through transcriptional upregulation of MCL-1." *Cell Death Differ* **17**(8): 1288-1301.
- Song, J. H. and Kraft, A. S.** (2012). "Pim kinase inhibitors sensitize prostate cancer cells to apoptosis triggered by Bcl-2 family inhibitor ABT-737." *Cancer Res* **72**(1): 294-303.
- Sova, P., Chladek, J., Zak, F., Mistr, A., Kroutil, A., Semerad, M. and Slovak, Z.** (2005). "Pharmacokinetics and tissue distribution of platinum in rats following single and multiple oral doses of LA-12 [(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)]." *Int J Pharm* **288**(1): 123-129.
- Sova, P., Mistr, A., Kroutil, A., Semerad, M., Chlubnova, H., Hruskova, V., Chladkova, J. and Chladek, J.** (2011). "A comparative study of pharmacokinetics, urinary excretion and tissue distribution of platinum in rats following a single-dose oral administration of two platinum(IV) complexes LA-12 (OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV) and satraplatin (OC-6-43)-bis(acetato)amminedichloro(cyclohexylamine)platinum(IV)." *Cancer Chemother Pharmacol* **67**(6): 1247-1256.
- Sova, P., Mistr, A., Kroutil, A., Zak, F., Pouckova, P. and Zadinova, M.** (2006). "Comparative anti-tumor efficacy of two orally administered platinum(IV) drugs in nude mice bearing human tumor xenografts." *Anticancer Drugs* **17**(2): 201-206.

- Stang, S. L., Lopez-Campistrous, A., Song, X., Dower, N. A., Blumberg, P. M., Wender, P. A. and Stone, J. C.** (2009). "A proapoptotic signaling pathway involving RasGRP, Erk, and Bim in B cells." *Exp Hematol* **37**(1): 122-134.
- Stubbert, L. J., Smith, J. M. and McKay, B. C.** (2010). "Decreased transcription-coupled nucleotide excision repair capacity is associated with increased p53- and MLH1-independent apoptosis in response to cisplatin." *BMC Cancer* **10**: 207.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R. and Srivastava, R. K.** (2001). "Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways." *Oncogene* **20**(17): 2122-2133.
- Svihalkova-Sindlerova, L., Foltinova, V., Vaculova, A., Horvath, V., Soucek, K., Sova, P., Hofmanova, J. and Kozubik, A.** (2010). "LA-12 overcomes confluence-dependent resistance of HT-29 colon cancer cells to Pt (II) compounds." *Anticancer Res* **30**(4): 1183-1188.
- Takahashi, M., Koi, M., Balaguer, F., Boland, C. R. and Goel, A.** (2011). "MSH3 mediates sensitization of colorectal cancer cells to cisplatin, oxaliplatin, and a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor." *J Biol Chem* **286**(14): 12157-12165.
- Tan, S., Hougardy, B. M., Meersma, G. J., Schaap, B., de Vries, E. G., van der Zee, A. G. and de Jong, S.** (2012). "Human papilloma virus 16 E6 RNA interference enhances cisplatin and death receptor-mediated apoptosis in human cervical carcinoma cells." *Mol Pharmacol* **81**(5): 701-709.
- Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J. M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V. J., Mak, T. W. and Ingram, A. J.** (2002). "ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53." *J Biol Chem* **277**(15): 12710-12717.
- Thompson, S. W., Davis, L. E., Kornfeld, M., Hilgers, R. D. and Standefer, J. C.** (1984). "Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies." *Cancer* **54**(7): 1269-1275.
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., Wasielewska, T., Welsbie, D., Chen, C. D., Higano, C. S., Beer, T. M., Hung, D. T., Scher, H. I., Jung, M. E. and Sawyers, C. L.** (2009). "Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer." *Science* **324**(5928): 787-790.
- Vaculová, A., Hofmanova, J., Zatloukalova, J. and Kozubik, A.** (2009). "Differences in TRAIL-induced changes of Mcl-1 expression among distinct human colon epithelial cell lines." *Exp Cell Res* **315**(19): 3259-3266.
- Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T. A., Risinger, J. I., Barrett, J. C., Hamilton, T. C. and Chaney, S. G.** (1998). "The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts." *Cancer Res* **58**(16): 3579-3585.
- Vondálová Blanářova, O., Jelinkova, I., Szoor, A., Skender, B., Soucek, K., Horvath, V., Vaculova, A., Andera, L., Sova, P., Szollosi, J., Hofmanova, J., Vereb, G. and Kozubik, A.** (2011). "Cisplatin and a potent platinum(IV) complex-mediated enhancement of TRAIL-induced cancer cells killing is associated with modulation of upstream events in the extrinsic apoptotic pathway." *Carcinogenesis* **32**(1): 42-51.
- Wang, X.** (2010). "Fresh platinum complexes with promising antitumor activity." *Anticancer Agents Med Chem* **10**(5): 396-411.
- Wang, X., Martindale, J. L. and Holbrook, N. J.** (2000). "Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis." *J Biol Chem* **275**(50): 39435-39443.
- Wang, Z. and Sun, Y.** (2008). "Identification and characterization of two splicing variants of human Noxa." *Anticancer Res* **28**(3A): 1667-1674.

Westerberg, C. M., Hagglund, H. and Nilsson, G. (2012). "Proteasome inhibition upregulates Bim and induces caspase-3-dependent apoptosis in human mast cells expressing the Kit D816V mutation." *Cell Death Dis* **3**: e417.

Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* **3**(6): 673-682.

Wosikowski, K., Lamphere, L., Unteregger, G., Jung, V., Kaplan, F., Xu, J. P., Rattel, B. and Caligiuri, M. (2007). "Preclinical antitumor activity of the oral platinum analog satraplatin." *Cancer Chemother Pharmacol* **60**(4): 589-600.

Wu, X. X. and Kakehi, Y. (2009). "Enhancement of lexatumumab-induced apoptosis in human solid cancer cells by Cisplatin in caspase-dependent manner." *Clin Cancer Res* **15**(6): 2039-2047.

Yakovlev, A. G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B. and Faden, A. I. (2004). "BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis." *J Biol Chem* **279**(27): 28367-28374.

Yang, Z., Schumaker, L. M., Egorin, M. J., Zuhowski, E. G., Guo, Z. and Cullen, K. J. (2006). "Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis." *Clin Cancer Res* **12**(19): 5817-5825.

Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59.

Zak, F., Turanek, J., Kroutil, A., Sova, P., Mistr, A., Poulova, A., Mikolin, P., Zak, Z., Kasna, A., Zaluska, D., Neca, J., Sindlerova, L. and Kozubik, A. (2004). "Platinum(IV) complex with adamantylamine as nonleaving amine group: synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity against a panel of cisplatin-resistant cancer cell lines." *J Med Chem* **47**(3): 761-763.

Zhang, L., Lopez, H., George, N. M., Liu, X., Pang, X. and Luo, X. (2011). "Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways." *Cell Death Differ* **18**(5): 864-873.

Zhivotovsky, B. (2003). "Caspases: the enzymes of death." *Essays Biochem* **39**: 25-40.

Obrázky:

Adams, J. M. and Cory, S. (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." *Oncogene* **26**(9): 1324-1337.

Danial, N. N. (2008). "BAD: undertaker by night, candyman by day." *Oncogene* **27 Suppl 1**: S53-70.

Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. and Walczak, H. (2007). "TRAIL signalling: decisions between life and death." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(7-8): 1462-1475.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C. and De Laurenzi, V. (2012). "Role of apoptosis in disease." *Aging (Albany NY)* **4**(5): 330-349.

Foltinová, V., Švihálková Šindlerová, L., Horváth, V., Sova, P., Hofmanová, J., Janisch, R. and Kozubík, A. (2008). "Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with satraplatin and LA-12, new Pt(IV)-based drugs . A MINIREVIEW." *SCRIPTA MEDICA (BRNO)* – **81** (2): 105–116, June 2008 **81**(2): 115-116.

Kelland, L. (2007). "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." *Nat Rev Cancer* **7**(8): 573-584.

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S. and Huang, D. C. (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." *EMBO J* **17**(2): 384-395.

Wang, X. (2010). "Fresh platinum complexes with promising antitumor activity." *Anticancer Agents Med Chem* **10**(5): 396-411.